

**Efeito “in vitro” de Tiosemicarbonas e seus derivados  
Tiazolidinônicos sobre o desenvolvimento intracelular do  
*Toxoplasma gondii***

**CARLA DE SALES PESSANHA**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES- RJ  
JULHO- 2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Efeito “in vitro” de Tiosemicarbonas e seus derivados  
Tiazolidinônicos sobre o desenvolvimento intracelular do  
*Toxoplasma gondii***

**CARLA DE SALES PESSANHA**

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia com ênfase em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Edésio José Tenório de Melo

CAMPOS DOS GOYTACAZES- RJ

JULHO – 2006

**Efeito “in vitro” de Tiosemicarbazonas e seus derivados  
Tiazolidinônicos sobre o desenvolvimento intracelular do  
*Toxoplasma gondii***

**CARLA DE SALES PESSANHA**

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia com ênfase em Biologia Celular.

Aprovada em 31 de julho de 2006.

Comissão Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Maura da Cunha (Doutora em Ciências - UENF).

---

Prof<sup>a</sup>. Olga Lima Tavares Machado (Doutora em Bioquímica - UENF).

---

Prof. Ulysses Garcia Casado Lins (Doutor em Ciências - UFRJ).

---

Prof. Edésio José Tenório de Melo (Doutor em Ciências - UENF).

Orientador

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela concretização de mais uma etapa na minha vida que incomparável e inconfundível na sua infinita bondade, compreendeu os meus anseios e me deu a necessária coragem para atingir mais um objetivo.

Aos meus pais, Antônio Carlos e Sonia Maria e a minha irmã Said, pela compreensão, apoio, força, carinho e ajuda que me deram durante todo esse período. Em todos os momentos, vocês sempre acreditaram em minha capacidade e viveram juntos cada conquista, a vocês só tenho a agradecer. Muito obrigada. Amo muito vocês!!!

A minha grande família: avô, tios, tias, primos, primas, agradeço a vocês por tudo. Sei que sempre torceram muito por mim. Muito obrigada. Amo todos vocês!!!!!!!

A equipe técnica do laboratório, principalmente, Rosimery, Giovana, Beatriz, Darly, Adriana e Márcia Adriana, pela força, carinho, dedicação e disponibilidade sempre na hora que precisei. Devo muito a vocês por todos esses anos de aprendizado. Para mim vocês foram muito mais que técnicas, foram amigas! Obrigada por tudo. Valeu! Adoro vocês!!!

As amigas, Cris, Sharlene, Keity, Iara, Cíntia, pela força e carinho. Principalmente a Cris que sempre se mostrou pronta a me ajudar em tudo que precisei. Muito obrigada !!!

As amigas Daniela, Lidiane e Gabriela, mesmo distantes, sei que sempre torceram por mim. Obrigada pela força, carinho e amizade. Adoro vocês!!!

Ao Fábio, que mais que namorado sempre foi minha **grande referência**. Obrigada pela força, carinho, ajuda, compreensão e amizade. Você sempre esteve ao meu lado, e nos momentos que mais precisei sempre se dispôs a me ajudar e me incentivar. Você é um exemplo a ser seguido! Te agradeço por tudo. Amo muito você!!!

As minhas primas, Carol e Kamilly, por compartilhar esse momento comigo e torcer por mais uma conquista minha. Valeu! Adoro vocês!!!

A minha sogra, Cidnéa, pelo carinho e pela força que sempre me deu. Você acompanhou de perto todas as minhas dificuldades. Obrigada por tudo!

Ao professor Edésio, pela orientação, ensinamentos e apoio indispensável para concretização desse trabalho.

A professora Valdirene pela revisão do trabalho.

Aos professores Ulysses Lins, Olga Machado e Maura da Cunha, por aceitarem fazer parte da comissão avaliadora do trabalho.

Em fim, a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1-INTRODUÇÃO</b> .....	2
1.1- Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	3
1.2- O taquizoíto.....	6
1.2.1- Organelas secretoras.....	7
1.2.1.1- Róptrias.....	8
1.2.1.2- Micronemas.....	9
1.2.1.3- Grânulos densos.....	10
1.2.2- O citoesqueleto.....	11
1.2.2.1- Função do citoesqueleto.....	13
1.2.3- O complexo trimembranar.....	14
1.3- Interação <i>Toxoplasma gondii</i> / célula hospedeira.....	14
1.3.1- Adesão do parasita à célula hospedeira.....	15
1.3.2- A invasão.....	16
1.3.3- Formação do vacúolo parasitóforo.....	18
1.3.4- Desenvolvimento intracelular.....	21
1.3.5- Liberação dos parasitas.....	23
1.4- Drogas anti-proliferativas.....	24
1.4.1- Tiosemicarbonas.....	25
1.4.2- Derivados Tiazolidinônicos (4-Tiazolidinônicos).....	26
1.4.3- Mecanismo de ação das Tiosemicarbonas.....	26
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	29
2.1- Objetivo geral.....	29
2.2- Objetivos específicos.....	29
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
3.1- A célula hospedeira.....	31
3.2- Obtenção dos parasitas.....	31
3.3- Interação do parasita com a célula hospedeira.....	32
3.4-Ação biológica dos compostos (citotoxicidade).....	33
3.5- Compostos/Síntese.....	33

3.6- Análise quantitativa.....	38
3.7- Análise da reversibilidade.....	38
3.8- Microscopia óptica.....	38
3.9- Microscopia eletrônica de transmissão.....	39
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
4.1- Ação biológica dos compostos (citotoxicidade).....	42
4.2- Análise quantitativa:Tiosemicarbazonas/Derivados Tiozolidinônicos..	43
4.3-Influência da estrutura química no mecanismo de ação dos compostos.....	46
4.4- Aspectos morfológicos da interação do parasita com a célula hospedeira.....	46
4.4.1- Tratamento com as Tiosemicarbazonas.....	48
4.4.2- Tratamento com os derivados Tiazolidinônicos.....	49
4.5- Análise da reversibilidade dos compostos.....	50
4.6- Aspectos ultraestruturais da interação do parasita com a célula hospedeira.....	51
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
5.1- Célula hospedeira/ <i>Toxoplasma gondii</i> .....	64
<b>6- CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>

## RESUMO

Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* ao infectarem a célula hospedeira se estabelecem dentro de um vacúolo modificado, denominado, vacúolo parasitóforo (VP) até ocorrer à lise celular. Esta lise é o principal fenômeno patológico da toxoplasmose, doença causada por esse parasita. As drogas utilizadas no tratamento da toxoplasmose não eliminam o parasita do organismo; além de causar uma série de efeitos colaterais ao hospedeiro e resistência do parasita ao quimioterápico. No presente estudo, novos compostos de Tiosemicarbazonas e seus derivados Tiazolidinônicos foram testados contra o desenvolvimento intracelular do *T. gondii* para observar seus efeitos tóxicos. Células Vero, foram infectadas, tratadas com os compostos e processadas para microscopia óptica e eletrônica de transmissão de rotina. As células infectadas com taquizoítos de *T. gondii* por 24h, mostram o parasita com sua forma característica de meia-lua na cultura controle. A partir de testes com diferentes concentrações dos compostos utilizados, foi possível estabelecer a concentração padrão utilizada para todos os compostos que foi de 1,5 mM. Após o tratamento com os compostos por 12h e 24h, a porcentagem de células infectadas e o número de parasitas intracelulares diminuíram drasticamente, sendo o seu efeito tempo-dependente. O tratamento com os compostos causou drásticas alterações morfológicas nos parasitas intravacuolares, que passaram a apresentar, dentro do VP, formato arredondado e também formas semelhantes a inclusões citoplasmáticas. A célula hospedeira, no entanto, pareceu inalterada nos tratamentos por 12h e 24h, porém no tratamento por 48h com os compostos, apresentou grandes alterações na sua morfologia, ficando com aspecto arredondado, não muito aderida ao substrato e citoplasma bastante denso. A análise da reversibilidade revelou que na ausência do derivado Tiosemicarbazona, a infecção de 24h não foi re-estabelecida pelos parasitas intracelulares, porém o mesmo não aconteceu com o derivado Tiazolidinônico, onde a infecção por 24h foi novamente estabelecida pelos parasitas que no decorrer do tratamento de 24h não foram afetados. Análises ultraestruturais mostraram que na presença dos compostos, os parasitas no interior do VP, encontram-se com citoplasma bastante vacuolizado e também com sua estrutura bem alterada,

confirmando o observado pela análise morfológica. Não houve alterações aparentes na célula hospedeira após o tratamento por 24h com o derivado Tiosemicarbazona, porém na presença do derivado Tiazolidinônico por 24h, mudanças na disposição das organelas e vacuolizações citoplasmáticas foram observadas nas células hospedeiras. Os resultados apresentados sugerem que a presença dos novos compostos alterou a morfologia, ultraestrutura e multiplicação dos taquizoítos de *T. gondii*, promovendo sua destruição e eliminação da cultura.

## ABSTRACT

Tachyzoites of *Toxoplasma gondii* during infection of the host cell establish inside of the modified vacuole called parasitophorous vacuole (PV) until the cell lyses. It is the main pathological phenomenon of the toxoplasmosis. Drugs used against toxoplasmosis do not eliminate the parasite from the organism. Besides take place a sort of host collateral effects and development of quimioterapic resistance by the parasite. At the present study, new compounds from Tiosemicarbazones and its derivates tioazolidinonics were tested against the intracellular development of *T. gondii* and its toxic effects observed. Vero cells used as host-cell were infected, followed by treatment with the different compounds and prepared for light and transmission electron microscopy. Twenty four hour tachyzoites-infected cells had shown intracellular parasite development and established the infection process. The citotoxic assay had indicated the 1,5 mM of the evaluated drug as a standard concentration. After the treatment with the compounds (12 and 24 hours), the percentage of infected cells as well the number of the intracellular parasites decreased drastically been observed a time-dependent effect. The treatment with the compounds took place pronounced morphological changes over the intravacuolar parasites, which had shown amorphous aspect. Nevertheless, the host cell seems to be unaltered. The reversibility experiment had shown that in the absence of the Tiosemicarbazone derivate, the 24h-infection were not established by the parasites, however it was not the case for the tiazolidinonic derivate, where the 24h-infection were established again. Electron microscopy observation revealed that the parasites inside the PV were destroyed in the presence of the tested compounds, which is in accordance with the light microscopy data. There were no notable changes at the host cell after the Tiosemicarbazone treatment for 24 hours, but in the presence of the derivate compounds (24 h exposed) alteration were observed in the host cell, which includes organelles distribution and cytoplasmatic vacuolization. The results obtained suggested that in the presence of these tested compounds, tachyzoites of *T. gondii* were effect in its structure, ultrastructure and multiplication causing its destruction and elimination from the culture.

# *Introdução*

# 1-INTRODUÇÃO

Parasitas intracelulares utilizam-se de diferentes mecanismos de internalização e sobrevivência na célula hospedeira. Esses mecanismos são fundamentais para o sucesso e disseminação da infecção no hospedeiro. Tais parasitas são responsáveis por diversas doenças que afetam animais de interesse veterinário e a população humana mundial.

Parasitas intracelulares pertencem a diferentes filos, entre eles, o filo Apicomplexa, que abrange 500 espécies de protozoários, todos parasitas **(Levine, 1988)**. Parasitas pertencentes a esse filo, como os dos gêneros: *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Sarcocystis*, *Teileria*, *Babesia*, possuem uma complexa estrutura apical denominada conóide **(Nichols & Chiappino, 1987; Morrissette et al., 1994)**; um complexo formado por três membranas que envolvem grande parte do corpo do parasita e uma via secretora extremamente polarizada responsável pela eficiência da invasão e infecção no hospedeiro, com a participação de três organelas: róptrias, micronemas e grânulos densos.

O *Toxoplasma gondii*, um parasita intracelular obrigatório é o agente causador da Toxoplasmose. Essa doença atinge diferentes hospedeiros, entre eles, o homem. A toxoplasmose é uma doença caracterizada pela lise e destruição celular-tecidual de vários órgãos do hospedeiro vertebrado. Essa destruição é mais drástica quando indivíduos estão imunocomprometidos **(Luft et al., 1993)** ou em feto em desenvolvimento embrionário **(Martin, 2001; Goldenberg & Thompson, 2003; Mozatto & Procianoy, 2003)**. Além disso, a Toxoplasmose passou a ser uma grave doença, causando a mortalidade, em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida -AIDS, comportando-se como uma das infecções mais sérias relacionadas à AIDS **(Luft & Remington, 1992; Kasper & Boothroyd, 1993)**

Tradicionalmente a terapia utilizada para a toxoplasmose leva ao controle da disseminação da infecção. No entanto, ela é insuficiente para eliminar as formas intracelulares dos parasitas.

A quimioterapia indicada para toxoplasmose, pirimetamina e sulfadiazina, sozinhas ou combinadas, induzem severos danos colaterais

quando utilizadas por um longo período (**Bosch-Driessen et al., 2002; Degerli et al., 2003**). Além disso, cepas de *T. gondii* desenvolveram resistência a estes compostos (**Sköld, 2000**). Esses compostos quimioterápicos usados contra a toxoplasmose são os mesmos também utilizados para outras infecções provocadas por Apicomplexas, como por exemplo, o *Plasmodium falciparum*, agente causador da malária, que também apresenta resistência às drogas.

Assim, o desenvolvimento de novos quimioterápicos se faz necessário, a fim de observar seus efeitos tóxicos, biológicos e celulares.

Nosso grupo de pesquisa, já vem avaliando a ação de compostos com diferentes alvos no aspecto da interação parasita/célula hospedeira. A interação parasita/célula hospedeira vem sendo um ótimo modelo de estudo para compostos com finalidade quimioterápica. No presente trabalho, serão utilizados novos compostos pertencentes à classe das Tiosemicarbazonas bem como seus derivados Tiazolidinônicos. Essa classe de compostos possui atividade anti-proliferativa e atua em fase específica do ciclo celular, comportando-se como agentes específicos de fase. Sendo assim, nosso objetivo principal, será avaliar os efeitos celulares causados por esses compostos, contra o desenvolvimento intracelular do *T. gondii*.

### **1.1- Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii***

Os primeiros a esclarecerem o ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* foram **Frenkel, 1990** e **Hutchinson & Dunachie, 1971**. O seu ciclo de vida é dividido entre duas classes de hospedeiros: hospedeiro definitivo (felídeos) e hospedeiro intermediário (vertebrados). Devido ao ciclo de vida, podemos encontrar formas de replicação e disseminação do parasita, por reprodução assexuada e formas de produção de gametas, por reprodução sexuada. O *T. gondii*, realiza o seu ciclo de vida completo no hospedeiro felino e apenas a reprodução assexuada nos hospedeiros vertebrados.

O ciclo nos felinos (ciclo enteroepitelial) ocorre quando oocistos ou cistos ingeridos pelo gato liberam respectivamente, esporozoítos e bradizoítos, onde estes por sua vez entram nas células epiteliais do intestino dando origem a esquizontes (**fig. 1**). Ao final do processo de esquizogonia, taquizoítos, a

forma de disseminação da infecção e responsável pelos danos patológicos, são formados, estabelecendo a infecção na célula hospedeira **(fig. 1)**.

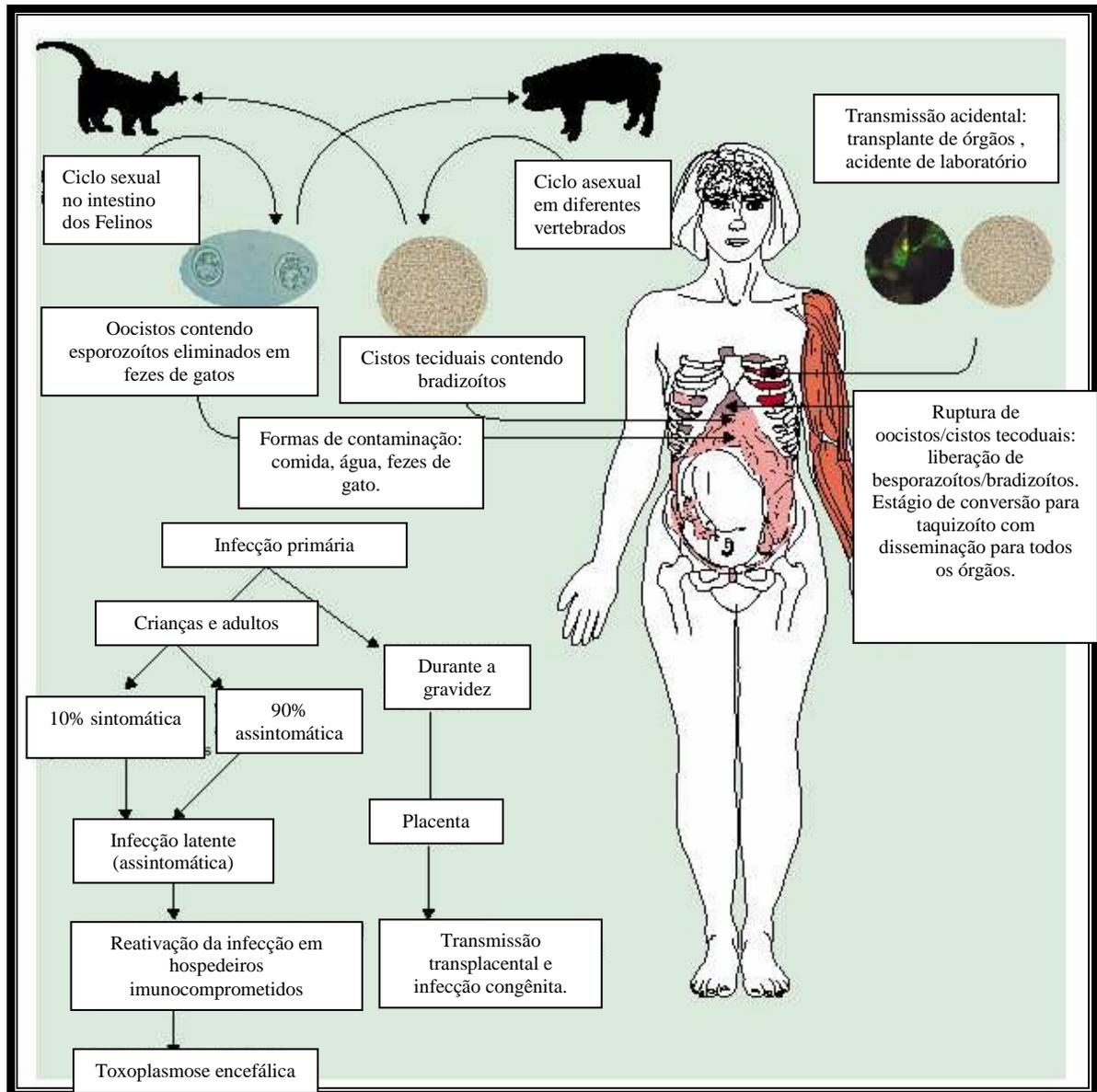
Durante o estabelecimento da infecção na célula hospedeira, taquizoítos são liberados após ocorrer à lise celular. Uma vez no ambiente extracelular, estão aptos a infectarem novas células hospedeiras, permitindo então que a infecção se perpetue. A forma taquizoíta da cepa RH, que será utilizada neste trabalho, caracteriza-se por ser uma forma de rápido crescimento e que se replica no interior da célula hospedeira aproximadamente 6 horas após sua internalização **(Pferffkorn, 1990)**.

Ainda no hospedeiro definitivo, alguns taquizoítos, no entanto, se diferenciam em gametócitos (microgametas e macrogametas). Estes gametócitos posteriormente se fundem formando o zigoto. O zigoto então evolui para oocistos, sendo eliminado pelas fezes **(fig.1)**. Dois esporocistos são formados, cada um com 4 esporozoítos, sendo que em 3 ou 4 dias encontram-se aptos para infectar outros hospedeiros. Este ciclo, como descrito, é característico dos felinos **(Frenkel et al., 1969)**. Durante a fase aguda, milhões de oocistos são liberados nas fezes dos gatos por um período que dura 7 a 21 dias **(Dubey et al., 1970)**. Estes sobrevivem no ambiente por um período considerável.

A fase extraintestinal, é caracterizada por apresentar somente a reprodução assexuada de taquizoítos/bradizoítos, ocorrendo em hospedeiros vertebrados intermediários **(fig. 1)**. Esta fase começa quando oocistos ou cistos teciduais ingeridos liberam respectivamente, esporozoítos ou bradizoítos, que por sua vez entram em várias células, nos diferentes tecidos **(fig.1)**. Uma vez nos tecidos, multiplicam-se formando taquizoítos que quando liberados infectam outras células, perpetuando a infecção. Essa fase consiste de 2 estágios distintos de crescimento: a fase aguda e a fase crônica, as quais estão relacionadas com as duas formas de infecção do parasita, taquizoíto e bradizoíto, respectivamente.

A toxoplasmose é uma doença em 90% dos casos assintomática, devido à infecção latente pelos parasitas. Isso se deve provavelmente a uma resposta imunológica eficiente **(Frenkel et al. 1970; Frenkel, 1990; Montoya & Liesenfeld, 2004)**. No entanto, em indivíduos imunocomprometidos, ocorre reativação da infecção pelos taquizoítos, através da conversão de bradizoítos

para taquizoítos, e sua conseqüente disseminação por todo o corpo (Luft *et al.*, 1984) (fig. 1).



**Figura 1-** Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* e manifestações clínicas (modificado Montoya & Liesenfeld, 2004).

No presente trabalho, será utilizado, o taquizoíto, forma infectiva de proliferação rápida do *Toxoplasma gondii*, como alvo para testes de drogas.

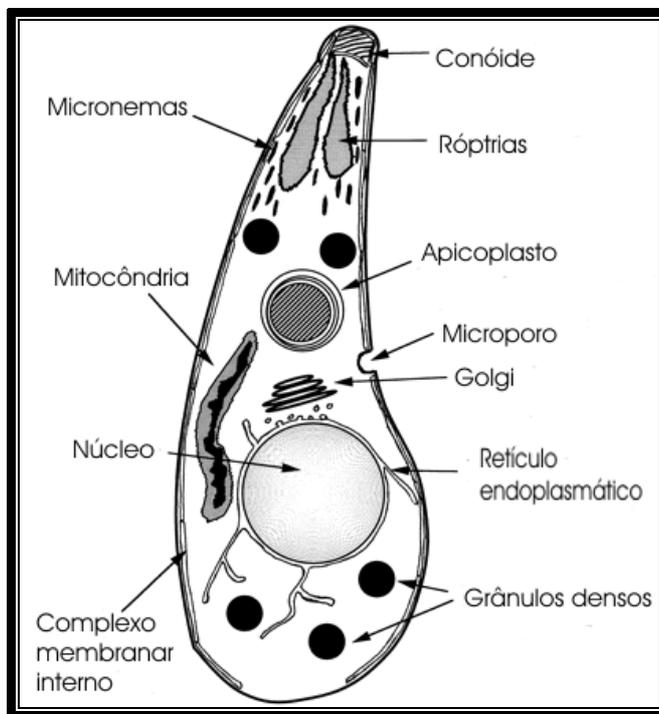
## 1.2- O taquizoíto

O taquizoíto, como demonstrado na **figura 2**, possui um corpo em forma de meia-lua, quando observado em microscopia óptica. O parasita mede aproximadamente 6-7 µm de comprimento por 1-2 µm de diâmetro, é revestido por uma estrutura trimembranar: uma membrana externa, a plasmalema, que envolve toda a superfície do parasita e duas membranas: a intermediária e a interna, que formam o Complexo Pelicular Interno (CPI) (**Sheffield & Melton, 1968; Pfefferkorn, 1990**). O CPI é descontínuo, sofrendo uma interrupção, o microporo, no meio do corpo do taquizoíto (**Melo & De Souza, 1997**). Na região anterior, também denominada complexo apical, encontra-se o conóide, uma estrutura formada por microtúbulos dispostos em forma angular, paralela e dividida em anéis transversais (**fig. 2 e fig. 3**). O último anel liga-se aos microtúbulos citoplasmáticos ou microtúbulos subpeliculares (**fig. 3**).

Ultraestruturalmente foi verificado que o taquizoíto apresenta todas as organelas típicas de outras células eucarióticas, incluindo: **núcleo**, que contém DNA e RNA. Está localizado na região central, tendendo à região posterior, a cromatina encontra-se dispersa por todo o núcleo, podendo ser visualizados um ou dois nucléolos, geralmente localizados no centro; **mitocôndria**, única, porém ramificada no citoplasma do parasita; **complexo de Golgi** situado na região perinuclear; **retículo endoplasmático**, predominantemente rugoso, localizado na porção posterior do corpo e lateralmente ao núcleo; **ribossomos** livres, uniformemente distribuídos por todo o citoplasma e **lisossomos**. Além disso, possui um plastídio, denominado apicoplasto, o qual é envolvido por quatro membranas (**Köhler et al., 1997; Scheffield & Melton, 1968**).

Possui ainda, organelas especiais de secreção denominadas: róptrias, micronemas e grânulos densos. Estas estão envolvidas no processo de adesão, invasão e sobrevivência do parasita na célula hospedeira. Róptrias e micronemas localizam-se na região do complexo apical, juntamente com o conóide (**De Souza & Souto-Padrón, 1978**) e os grânulos densos, encontram-se homoganeamente distribuídos no citoplasma do parasita.

Após o mecanismo de invasão, o parasita se estabelece e se desenvolve dentro de um vacúolo modificado, formado no interior da célula hospedeira, denominado vacúolo parasitóforo (VP) (Dubremetz *et al.*, 1998).



**Figura 2-** Esquema de taquizoítos de *T.gondii* ilustrando as organelas e estruturas presentes no parasita. Modificado de **Black & Boothroyd, 2000**.

### 1.2.1- Organelas secretoras

O *Toxoplasma gondii*, como descrito anteriormente, possui um número de organelas secretoras distribuídas de diferentes formas em seu interior, incluindo micronemas e róptrias na porção apical e grânulos densos com uma localização mais generalizada (Ngo *et al.*, 2000). Cada organela tem seu próprio complemento de proteínas consistente com a sua liberação (Carruthers & Sibley, 1997). Micronemas liberam o seu conteúdo durante o processo inicial de adesão-invasão da célula hospedeira, róptrias liberam durante o processo invasivo e finalmente grânulos densos, descarregam a maioria do seu conteúdo durante o desenvolvimento do parasita no ambiente intracelular.

### 1.2.1.1- Róptrias

São organelas em forma de clava e localizam-se na porção terminal do conóide. A origem das róptrias é ainda pouco conhecida. Estudos com *Sarcocystis tenella* mostram que róptrias originaram através de uma vesiculação, derivada do complexo de Golgi (**Mehlhorn et al., 1975**).

O número de róptrias em *T. gondii*, varia nos diferentes estágios do parasita. No taquizoíto, essas organelas contêm mais de 8 proteínas, denominadas de ROPs (**Beckers et al., 1997; Leriche & Dubremetz, 1991; Ossorio et al., 1992**). Destas, algumas se associam à membrana do vacúolo parasitóforo (**Beckers et al., 1994; Saffer et al., 1992**) e outras têm seus papéis relacionados com o aumento da fluidez da membrana da célula hospedeira, facilitando a invasão do parasita e formação da membrana vacuolar. O produto secretado pelas róptrias, no momento e durante a invasão, foi primeiramente denominado de fator de aumento de penetração (FAP), facilitando dessa forma, a entrada do parasita na célula hospedeira (**Saffer et al., 1992; Beckers et al., 1994**).

A secreção de róptrias aparentemente não depende da adesão do parasita à célula hospedeira. O material secretado por essas organelas, possui um papel fundamental na invasão do parasita na célula hospedeira. Imediatamente após o processo inicial do contato do parasita com a célula hospedeira, o conteúdo das róptrias é secretado dentro do citoplasma da célula hospedeira (**Nichols et al., 1983**).

Ademais, róptrias são organelas ricas em colesterol e fosfatidilcolina e sua captação se dá através do citoplasma da célula para o interior do vacúolo, incorporando, estes compostos, na membrana plasmática e na membrana das róptrias (**Foussard et al., 1991**).

Estudos sugerem que róptrias secretam ainda, lipídeos na membrana do vacúolo parasitóforo e que uma fosfolipase A2 estaria associada com a invasão (**Saffer et al., 1992; Dubremetz et al., 1993; Carruthers & Sibley, 1997**).

### 1.2.1.2- Micronemas

São pequenas vesículas localizadas na região apical dos parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa. Essas organelas apicais, contêm várias proteínas com características adesivas que são secretadas durante a adesão do parasita à membrana plasmática da célula hospedeira, tais proteínas são conhecidas como MICs. Essas adesinas são liberadas da porção apical do parasita durante o processo inicial da invasão **(Carruthers & Sibley, 1999)**. Sendo assim, uma variedade de proteínas micronemas são conhecidas por promover a adesão do parasita à célula hospedeira, incluindo, em *T. gondii*, as proteínas de micronemas MIC1 **(Fourmaux et al., 1996)** e MIC2 **(Wan et al., 1997)**.

A proteína MIC3 foi identificada e caracterizada como uma nova adesina de *T. gondii* **(Garcia-Réguet et al., 2000)** e é secretada por micronemas de taquizoítos extracelulares **(Archbarou et al., 1991)**. Além disso, MIC3 se liga a um grande número de células hospedeiras **(Garcia-Réguet et al., 2000)**

A liberação do conteúdo de micronemas ocorre no final anterior do parasita que está em contato com a superfície célula hospedeira **(Entzeroth et al., 1992)**. A exocitose de MIC3 e MIC2 ocorre no estágio inicial do processo de invasivo **(Carruthers & Sibley, 1997)**, na zona formada entre o parasita e a célula hospedeira **(Carruthers & Sibley, 1997)**. No entanto, a proteína MIC3 difere da MIC2 pela presença de um domínio transmembrana que é responsável pela associação do parasita à célula hospedeira **(Sibley et al., 1998)**. Estudos com a proteína MIC2 de *T. gondii*, sugerem que as proteínas secretadas por micronemas são requeridas para uma invasão otimizada **(Brossier et al., 2003)**.

Estudos sugerem ainda, que a secreção de micronemas é controlada por uma via de transdução de sinais, que é regulada pelo cálcio intracelular do parasita e ionóforos de cálcio **(Carruthers & Sibley, 1999)**. Um elevado nível de cálcio no parasita, acarreta na liberação do conteúdo de micronemas, porém, não de róprias e grânulos densos. Sendo assim, o íon cálcio é um regulador da secreção de micronemas **(Carruthers et al., 1999; Carruthers & Sibley 1999)**.

### 1.2.1.3- Grânulos densos

São estruturas eletrondensas (corpos densos) dispersos no citoplasma do taquizoítos. São formados provavelmente, por “brotamento” do complexo de Golgi. Desempenham um papel fundamental na sobrevivência intracelular dos parasitas, pois sua secreção ocorre após a invasão do parasita na célula hospedeira. A secreção dos grânulos densos tem sido caracterizada como uma via secretora constitutiva (**Chaturveti et al., 1999**) ocorrendo provavelmente uma regulação em seu processo (**Carruthers & Sibley, 1997**).

O conteúdo exocitado pelos grânulos densos é mais evidente entre 10-20 minutos após a invasão. Em *T. gondii*, essa via de secreção é regulada, extremamente desenvolvida e implica na modificação da membrana do vacúolo parasitóforo (VP), caracterizando-o como um vacúolo modificado. Então, os grânulos densos são primordiais na sobrevivência do parasita no interior do VP.

As modificações ocorridas na membrana do VP, juntamente com os produtos secretados por róprias e miconemas durante o processo de invasão, implicam no impedimento da acidificação e fusão do VP com as organelas da via endocíticas da célula hospedeira.

As proteínas de grânulos densos são conhecidas como GRAs. GRA2 e GRA3 são exocitadas dentro do vacúolo parasitóforo poucos minutos após a infecção.

A secreção de grânulos densos contribui também para a elaboração da rede intravacuolar e túbulos membranosos no interior do VP.

Algumas proteínas secretadas por grânulos densos (GRA3; GRA5; GRA7 e GRA8) são incorporadas na membrana do vacúolo parasitóforo, enquanto outras (GRA2; GRA4 e GRA6) formam um complexo que interage com as membranas da rede intravacuolar, que é estabilizado por interações hidrofóbicas (GRA2 e GRA6) e interações proteína-proteína (GRA4) (**Labruyere et al., 1999; Lecordier et al., 1999**). Duas regiões anfipáticas em alpha-hélice de GRA2 são responsáveis por mediar sua associação com a rede intravacuolar (**Mercier et al., 1998**). Ambas as proteínas, GRA2 e GRA6 desempenham um importante papel na organização da rede (**Mercier et al., 2002**). Estudos evidenciam que uma nova proteína de grânulos densos, a

GRA9, encontra-se também associada à rede intravacuolar, juntamente com GRA2, GRA4 e GRA6 (**Adjogle et al., 2004**)

Devido à importância das organelas secretoras no desenvolvimento do *T. gondii*, muita atenção tem sido direcionada a respeito da identificação e função de seus conteúdos protéicos. Um tema comum, emergente desses estudos, é que o processamento proteolítico ocorre durante a maturação de muitas dessas proteínas, ambos durante o tráfego na via secretora. Estudos evidenciam que a eficiência da exocitose de organelas do parasita é criticamente influenciada pela redução do conteúdo de colesterol da célula hospedeira, mas não do parasita (**Coppens & Joiner, 2003**).

### 1.2.2- O Citoesqueleto

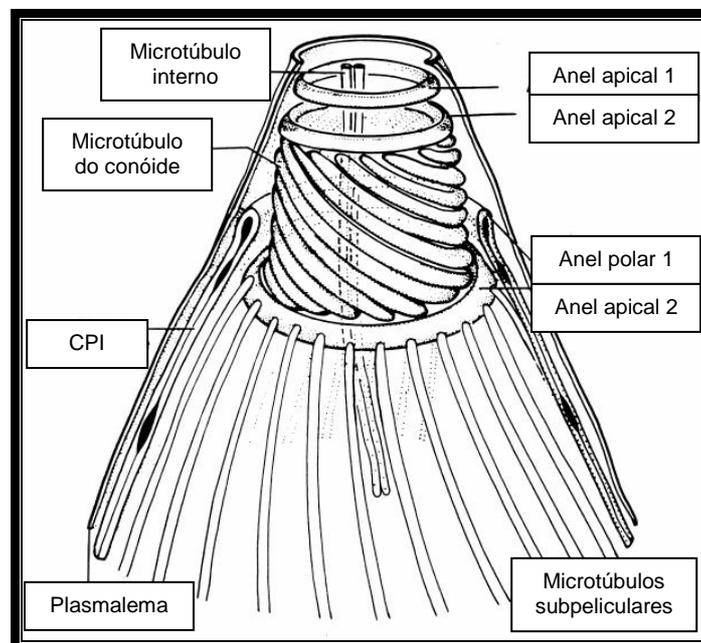
O citoesqueleto do *T. gondii* é um complexo formado por microtúbulos e outras macromoléculas que estão aparentemente envolvidas na integridade estrutural, no direcionamento da secreção polarizada e na habilidade com que o parasita se move através da superfície para invadir as células hospedeiras (**Nichols & Chiappino, 1987; Frixione et al., 1996; Morrissette et al., 1997**).

O conóide, como descrito anteriormente, localiza-se na porção anterior do parasita e encontra-se envolvido por dois anéis, denominados anéis pré-conoidais (**fig. 3**). É constituído por 14 elementos que se dispõem em sentido contrário ao pólo posterior. Dois microtúbulos de aproximadamente 400 nm estendem-se dos anéis pré-conoidais passando através do centro do conóide, terminando no interior do corpo do parasita (**fig. 3**). Estes túbulos estão ligados firmemente e imersos numa matriz densa que está associada à róptrias e micronemas apicalmente (**fig. 4**). Postula-se que microtúbulos funcionam como um suporte, direcionando as organelas para passar através do conóide e secretar seus conteúdos na região apical (**Nichols & Chiappino, 1987**).

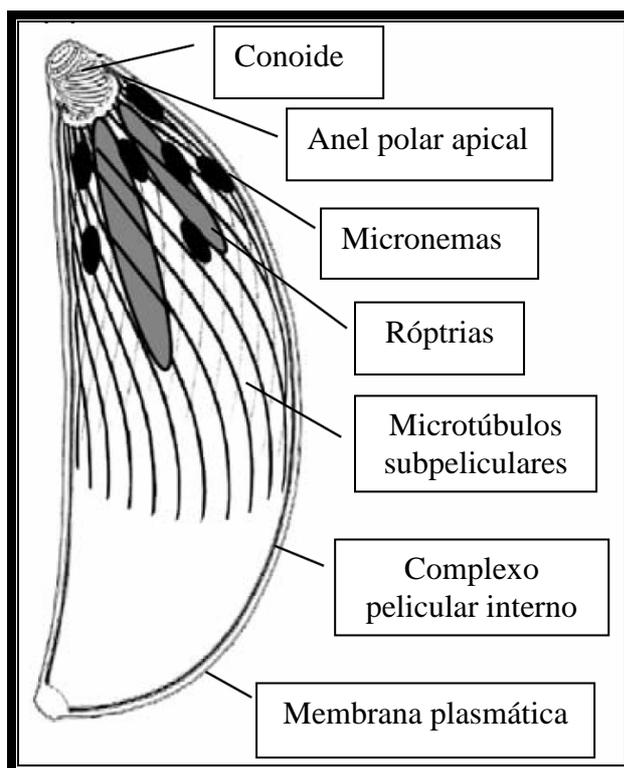
Exatamente posterior ao conóide, o anel polar funciona como um centro organizador de microtúbulos com 22 microtúbulos dispostos em espiral, alinhados em orientação contrária como as subunidades do conóide (**Russell & Burns, 1984**). Microfilamentos não têm sido observados nessa estrutura (**Cintra & De Souza, 1985**), porém, actina tem sido detectada no conóide, em

anéis pré-conoidais e microtúbulos subpeliculares (Yasuda *et al.*, 1988) (fig. 4).

Actina é codificada por somente um gene em *T. gondii* e é geralmente encontrada na forma solúvel monomérica no citoplasma (Dobrowolski *et al.*, 1997). Miosina, uma mecanoprotéina que interage com a actina, localiza-se juntamente com actina na porção anterior do parasita, bem como ao longo do complexo pelicular interno (Dobrowolski *et al.*, 1997; Schwartzman & Pefferkorn, 1983). O conóide é composto também por tubulina polimérica (Hu *et al.*, 2002).



**Figura 3-** Representação esquemática do complexo apical de *T. gondii* (modificado Dubey *et al.*, 1998).



**Figura 4-** Representação esquemática do taquizoíta e estruturas subpeliculares envolvidas na mobilidade e invasão da célula hospedeira (**modificado Soldati & Meissner, 2004**).

### 1.2.2.1- Função do citoesqueleto do parasita

O citoesqueleto de actina do parasita possui um papel fundamental na invasão das células hospedeiras por parasitas Apicomplexas (**Dobrowolski et al., 1997; Pinder et al., 2000**). Particularmente, em *T. gondii*, a mobilidade e a invasão da célula hospedeira são iniciadas pelo citoesqueleto de actina e mais provavelmente por proteínas motoras como a miosina (**Dobrowolski & Sibley, 1997**). **Wetzel et al., (2003)** também mostram que a mobilidade do parasita é controlada pela regulação da polimerização do filamento de actina.

Os microtúbulos possuem um papel essencial durante a divisão do parasita, distinguindo do papel do citoesqueleto de actina, contribuindo para o surgimento das organelas no interior células-filhas (**Shaw et al., 2000**). Ambos, microtúbulos e citoesqueleto de actina, são componentes essenciais na maquinaria responsável pela segregação genômica e divisão celular em eucariotos (**Field et al., 1999; Goode et al., 2000**). A classe II de miosina atua como um processo essencial durante a separação das células filhas no

processo de endodiogenia (**Robinson & Spudich, 2000; revisado em Bezanilla et al., 2000**).

Dados do nosso grupo de pesquisa mostram que, as drogas Taxol e Colchicina, utilizadas contra microtúbulos são eficientes em destruir o parasita intracelular (**Passos & Melo, 1999; Melo et al., 2001**), evidenciando, dessa forma, o papel fundamental dos microtúbulos.

### 1.2.3- O Complexo Trimembranar

O *T. gondii*, como descrito, é revestido por um complexo trimembranar interno, que é constituído de vesículas membranosas achatadas que se localizam abaixo da membrana plasmática (**Ogino & Yoneda, 1966**). Esse complexo é caracterizado pela presença de membranas paralelas compostas por partículas intermembranosas aderidas às mesmas (**Morrisette & Sibley, 2002**).

Em Apicomplexas, essa estrutura trimembranar é denominada película, sendo conhecida também como complexo pelicular interno. Esse complexo, como já descrito, não é contínuo em toda a extensão do corpo do parasita, sofrendo portanto uma interrupção, o microporo, que está posicionado no meio do corpo do parasita (**Melo & De Souza, 1997**). Acredita-se que esse poro seja um sítio ativo da endocitose. Vesículas também têm sido observadas nesta região aparentando ter revestimento de clatrina (**Nichols et al., 1994**).

## 1.3- Interação *Toxoplasma gondii* /Célula hospedeira

Durante o ciclo intracelular do *T. gondii* diferentes etapas são evidenciadas, incluindo: a adesão, a invasão e a replicação do parasita no interior da célula hospedeira e a sua conseqüente liberação para meio extracelular (**Black & Boothroyd, 2000**) (fig. 5).

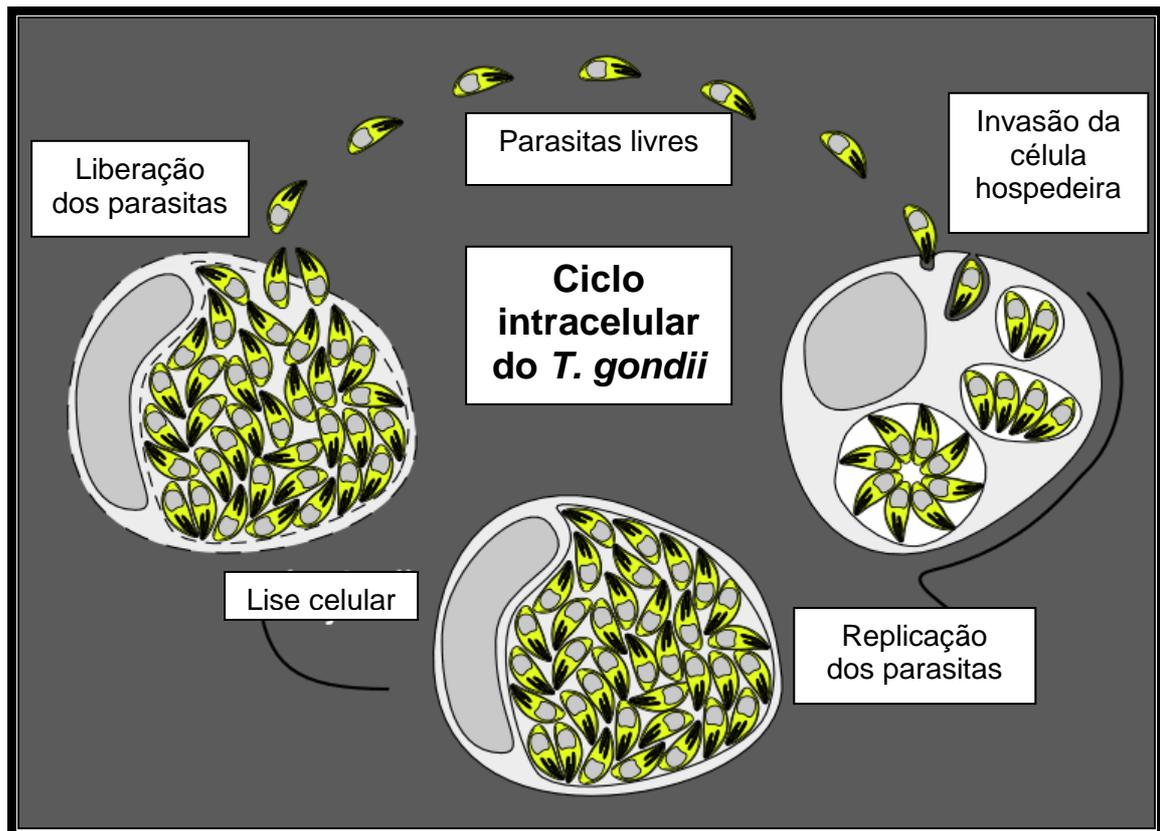


Figura 5- Ciclo intracelular do *T. gondii* ( [www.arches.uga.edu/~gubbels/LyticCycle](http://www.arches.uga.edu/~gubbels/LyticCycle)).

### 1.3.1- Adesão do parasita à célula hospedeira

Devido à ampla variedade de células hospedeiras infectadas pelo *T. gondii* em diferentes animais vertebrados, diferindo-se, contudo, da maioria dos patógenos (**Werk, 1985**), supõe-se que há participação de alguma molécula de ampla distribuição entre os tipos celulares envolvidos nesse processo. Tal molécula pode funcionar como receptor ou ligante para o acoplamento do parasita. Alguns componentes da matriz extracelular como fibronectina e laminina foram investigados e o reconhecimento do parasita pela célula hospedeira parece envolver: laminina e receptor para laminina na célula hospedeira (**Furtado et al., 1992 a,b**); moléculas semelhantes a lectinas na superfície do parasita (**Robert et al., 1991**); proteínas majoritárias da superfície tipo SAG-1 (P-30) (**Grimwood & Smith, 1992; Míneo & Kasper, 1994; Manger et al., 1998**) e um receptor glicosilado da célula hospedeira.

A proteína de superfície, SAG-1 (P-30) do taquizoíto associa-se com a membrana da célula hospedeira no momento da adesão. Essa proteína é sintetizada pelos parasitas intracelulares, localizando-se na superfície do parasita ou na membrana vacuolar (**Grimwood & Smith, 1992; Míneo & Kasper, 1994**). Dados sugerem também, que lectinas do parasita possam mediar a adesão na célula hospedeira (**Robert et al., 1991**) (**fig. 6**).

Apesar do *T.gondii* infectar um grande número de células eucarióticas, a maioria das informações disponíveis sobre a interação do *T. gondii* com células hospedeiras tem sido obtidas de fibroblastos, células epiteliais e macrófagos (**Silva et al., 1982; Morizaki et al., 1995 Dobrowolski & Sibley, 1996; Melo et al., 2001; De Souza et al., 1998**).

### 1.3.2- A invasão

O *Toxoplasma gondii* invade a célula hospedeira por um processo que envolve provavelmente actina (**Dobrowolski & Sibley, 1997; Endo et al., 1998**), miosina (**Schwartzman & Pfefferkorn, 1983; Dobrowolski et al., 1997; Meisner et al., 2002**), microtúbulos do parasita (**Schwartzman et al., 1985 ; Werk, 1985**) e também através do aumento da fluidez da membrana da célula hospedeira produzida pelo fator FAP secretado pelas róprias. Esse processo dura cerca de 15 segundos em taquizoítos da cepa RH (**Kasper & Mineo, 1994**).

O parasita é capaz de ganhar o meio intracelular da célula hospedeira através do mecanismo de penetração ativa (**Nichols & O'Connor, 1981; Silva et al., 1982; Nichols et al., 1983; Werk, 1985; Bonhomme et al., 1992; Dubremetz & Swartzman, 1993; Joiner & Dubremetz, 1993; Sibley, 1995; Speer et al., 1997; De Souza et al., 1998**).

A penetração ativa depende apenas da secreção dos produtos das organelas secretoras, nesse processo, a membrana do vacúolo a ser formado é constituída de componentes da célula hospedeira e do próprio parasita (**fig. 6**). É interessante ressaltar, que o parasita pode ser fagocitado durante interação com células fagocíticas, porém esse processo difere-se em amplos aspectos do processo de penetração ativa, sobretudo no que se refere a formação do VP.

A invasão permite a formação do VP e a sobrevivência do *T. gondii*. Quando o parasita está viável no interior do vacúolo, há impedimento da fusão do VP com lisossomos e vesículas endocíticas, além disso, não dispara a formação de radicais superóxidos pela célula hospedeira (**Sibley et al., 1985; Wilson et al., 1991**).

Durante o processo invasivo do parasita, diferentes eventos são estabelecidos, entre eles: protusão do conóide; exocitose do conteúdo das micronemas e róptrias; adesão à célula hospedeira (pela porção anterior do parasita); formação da “junção móvel” que desloca o parasita do sentido anterior ao posterior do seu corpo; mobilização de cálcio e atividades de fosfolipases do parasita; culminando na formação de um vacúolo endocítico modificado (**Morisaki et al., 1995; Ngo et al., 2000**) (**fig. 6**). Essa seqüência de eventos é estabelecida por parasitas Apicomplexas, sendo, geralmente conservada em algumas espécies desse filo.

Os processos executados pelo complexo apical do parasita envolvem a extensão do conóide e a secreção de róptrias e micronemas, onde culminará na penetração do parasita através da membrana da célula hospedeira. O processo de invasão do parasita altera as propriedades da membrana da célula hospedeira e também da membrana do vacúolo do VP, caracterizando-a como uma membrana mista (**Joiner & Dubremetz, 1993; Sibley, 1993; Kasper & Míneo, 1994**). Dessa forma, a membrana da célula hospedeira é o principal alvo do parasita no momento de sua penetração (**Carruthers et al., 1999**).

Além disso, durante a penetração do parasita na célula hospedeira, a “junção móvel” formada entre o parasita e a membrana da célula hospedeira, envolve componentes presentes na superfície da membrana ancorados ao citoesqueleto do *T.gondii*.

A invasão do parasita é bloqueada por substâncias que inibem microfilamentos, mas não pelas substâncias que inibem os microtúbulos (**Mondragon et al., 1994; Dobrowolski et al., 1997; Ryning & Remington, 1998**).

A invasão dos taquizoítos na célula hospedeira é ainda, dependente, entre outros, do gradiente de pH, determinado por íons extracelulares, sendo o pH interno maior que o externo (**Endo & Yagita, 1990**). Esse processo

provavelmente envolve actina (**Endo et al., 1998**), miosina (**Schwartzman & Pefefferkorn, 1983**) e microtúbulos (**Schwartzman et al., 1985; Werk, 1985**).

Dados publicados sugerem ainda, que proteases são importantes na invasão por Apicomplexas, biogênese organelar e desenvolvimento intracelular (**Kim, 2004**), incluindo também a invasão de parasitas pertencentes ao gênero *Plasmodium* (**Blackman, 2000**). Esses dados são mais limitados para o *Toxoplasma gondii*, mas estudos com inibidores de serina proteases, DCI e AEBSF, promovem a inibição da invasão, mas não a mobilidade desse parasita (**Conseil et al., 1999**). Inibidores de cisteína protease têm também promovido a inibição da invasão pelo *T. gondii*.

No processo de invasão, como descrito anteriormente, moléculas presentes na superfície do parasita são reconhecidas por receptores presentes na superfície da célula hospedeira, como a laminina presente na membrana do taquizoíto pode ser reconhecida pelo receptor de laminina presente na célula hospedeira -  $\alpha\beta 1$  integrinas; SAG1 (P-30), a proteína majoritária presente na superfície do parasita, é reconhecida por um receptor glicosilado presente na superfície da célula hospedeira (**Furtado et al., 1992 a,b; Kasper & Míneo, 1994; Míneo & Kasper, 1994**).

**Ortega-Barria & Boothroyd, (1999)**, mostram que açúcares sulfatados na superfície da célula hospedeira atuam também como receptores-chaves para o parasita. Além disso, estudos mostram que a invasão da célula hospedeira pelos parasitas pode ser bloqueada através da utilização de anticorpos contra as proteínas de superfície SAG-1 (**Míneo et al., 1993**).

### 1.3.3- Formação do Vacúolo Parasitóforo

Após o processo de invasão da célula hospedeira, como descrito, ocorre a formação de um vacúolo modificado no citoplasma da célula hospedeira, identificado como vacúolo parasitóforo (VP) (**Dubremetz et al., 1998**) (**fig. 6**). O vacúolo parasitóforo caracteriza-se por ser um vacúolo não-fusogênico, não participando, portanto, da via endocítica (**Joiner et al., 1990; Jones & Hirsh, 1972**). O lúmen vacuolar e a membrana do VP (MVP) servem como interface entre o parasita e o citoplasma da célula hospedeira.

A MVP é derivada inicialmente da membrana plasmática da célula hospedeira e é extensivamente modificada pela fusão dos conteúdos secretados pelas organelas que contribuem para a função e o destino dessa membrana **(Hakansson et al., 2001)**, designando assim, sua caracterização mista. Esta constituição pode ser responsável pela inibição da fusão dos lisossomos com o VP. Além do mais, proteínas incluídas na MVP servem como transportadoras de nutrientes e metabólicos de baixo peso molecular. Assim, a MVP, funciona como uma peneira molecular no tráfego entre o citoplasma da célula hospedeira e o lúmen do VP **(Hakansson et al., 2001)**.

No interior do VP, ocorre a replicação e o desenvolvimento do parasita, com sua multiplicação intracelular “in vitro” ocorrendo em intervalos de aproximadamente 6 horas, em cepas RH de *T. gondii* **(Pferffkorn, 1990)**.

Durante o processo invasivo, modificações ultraestruturais e funcionais na célula hospedeira são estabelecidas. Com a infecção, ocorre uma redistribuição de organelas da célula hospedeira, tais como: mitocôndrias e retículo endoplasmático, que se localizam ao redor do vacúolo parasitóforo **(Melo & De Souza, 1997; Carruthers & Sibley, 1997; Hakansson et al., 2001; Sinai & Joiner, 2001; Sinai et al., 1997)** (fig. 6). A associação das organelas citoplasmáticas com o VP pode ser importante para o fornecimento de lipídios para o vacúolo **(Trotter & Voelker, 1994)**, já que o *T. gondii* é incapaz de sintetizar ácidos graxos *de novo* **(Sinai et al., 1997)**. A interação com o retículo pode prover meios para o transporte de lipídios para os parasitas intracelulares através da rede tubulovesicular **(Black & Boothroyd, 2000)**.

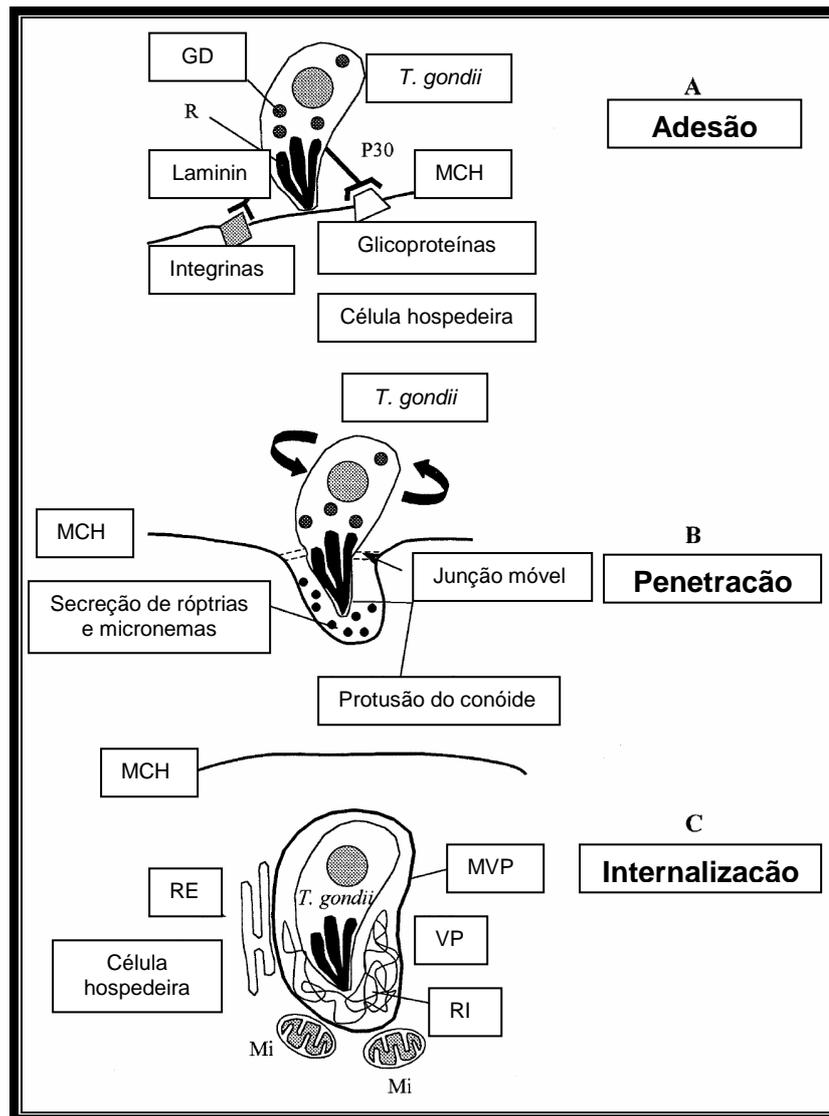
A associação de mitocôndria e retículo endoplasmático com a membrana do vacúolo está relacionada ao mecanismo de entrada do parasita. Quando são fagocitados, por exemplo, não ocorre a redistribuição de mitocôndria e retículo ao redor do vacúolo. Contudo, no mecanismo de penetração ativa, possibilita a formação de um vacúolo não fusogênico, contendo parasitas viáveis. Entretanto a manutenção desta associação não depende da viabilidade do parasita intravacuolar, como foi observada em estudos anteriores usando níveis microbicidas de pirimetamina em células infectadas **(Sinai et al., 1997)**.

Estudos sugerem ainda, que a associação das organelas é um processo direcionado pelo parasita, com a proteína ROP2 direcionando a mitocôndria da célula hospedeira para a membrana do VP **(Sinai & Joiner, 2001)**. Presumivelmente outras proteínas de róprias são responsáveis também, pelo ancoramento do RE da célula hospedeira na membrana do VP, necessitando, porém, de uma investigação maior.

Além da redistribuição de mitocôndria e retículo, a infecção por *T. gondii* interfere também significativamente na distribuição espacial dos microtúbulos da célula hospedeira **(Melo et al., 2001)**. Em células Vero infectadas com *T. gondii*, os microtúbulos se localizam preferencialmente ao redor do vacúolo parasitóforo e do núcleo da célula hospedeira **(Melo et al., 2001)**. A localização perinuclear do vacúolo parasitóforo está relacionada com o arranjo de elementos do citoesqueleto, como filamentos intermediários e também com o centro organizador de microtúbulos **(Halonen & Weidner, 1994)**. A associação entre filamentos do citoesqueleto, principalmente microtúbulos, com o vacúolo parasitóforo pode ser importante no deslocamento de organelas como mitocôndrias e elementos do retículo, além de vesículas.

Estudos do nosso grupo de pesquisa mostram que o uso de drogas como Taxol e Colchicina, além de destruir o parasita intracelular, com o já mencionado, interrompem a dinâmica de microtúbulos e a redistribuição de organelas da célula hospedeira como: mitocôndria e RE **(Melo et al., 2001)**.

Uma vez dentro da célula hospedeira, o *T. gondii* inicia a secreção dos conteúdos de grânulos densos **(Charif et al., 1990; Leriche & Dubremetz, 1991)**. A secreção dessa terceira estrutura secretora é responsável pela modificação do espaço intravacuolar e pela formação de uma rede complexa de túbulos membranosos, denominada rede intravacuolar **(Sibley et al., 1986; Sibley et al., 1995)**.



**Figura 6-** Processo de invasão do *Toxoplasma gondii*. **A-** adesão do parasita à membrana da célula hospedeira (MCH), com a participação de rôptrias (R), laminina e seu receptor, P30 e seu receptor. DG- grânulos densos. **B-** penetração do parasita com a formação da junção móvel, secreção de rôptrias e micronemas e protusão do conóide. **C-** Internalização do parasita com seu estabelecimento no interior do VP. MVP- membrana do vacúolo parasitóforo, RE- retículo endoplasmático, Mi- mitocôndria, RI- rede intravacuolar. **(modificado Bonhomme et al., 1999).**

Após o estabelecimento no vacúolo parasitóforo, o *T. gondii* se desenvolve até estar preparado para se dividir.

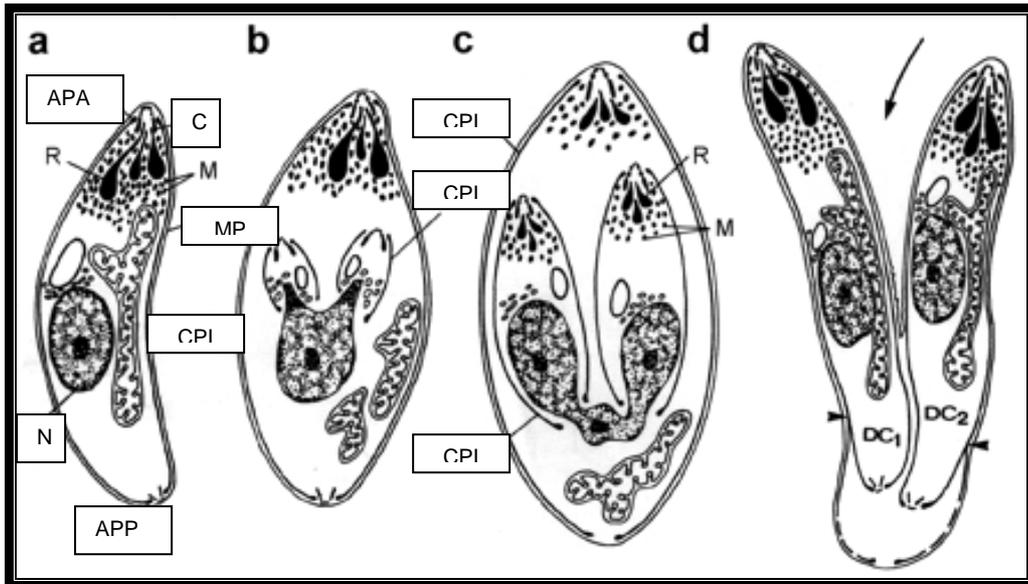
#### 1.3.4- Desenvolvimento intracelular

O *Toxoplasma gondii* se divide no ambiente intracelular por um tipo diferente de divisão binária conhecida como **endogenia ou endodiogenia**

(Gavin *et al.*, 1962). Neste processo, duas células-filhas são formadas a partir de uma célula mãe (fig. 7). Desse modo, o conjunto assume a forma de “bagos de laranja” ou de uma “rosácea” formada com 8, 16, 32 ou mais parasitas (De Souza, 1994). A formação da rosácea é em parte, um artifício, pela aderência das células à lamínula em cultura, perdendo espessura (Nichols & O’Connor, 1981). As divisões ocorrem no interior do vacúolo endocítico que contém o parasita, ou seja, no VP (Guimarães & Meyer, 1942). Dentro desse vacúolo, a divisão do parasita é extremamente sincronizada, no entanto, numa cultura infectada como um todo ou no organismo do hospedeiro, o *Toxoplasma gondii* multiplica-se assincronicamente.

O primeiro passo no processo endodiogênico é a replicação do DNA nuclear e a duplicação do centrosomo (Striepen *et al.*, 2000). O próximo evento é o surgimento de dois conóides no extremo apical (fig. 7). Simultaneamente, o complexo pelicular interno é sintetizado adjacente aos microtúbulos subpeliculares. Em conjunto com os centrosomos, o desenvolvimento do complexo pelicular parece separar o complexo de Golgi, o RE, a mitocôndria e o núcleo, dividindo dessa forma essas organelas entre as duas células-filhas. As organelas secretoras são sintetizadas antes da organização no interior do complexo apical das células-filhas. No evento terminal da endodoogenia, microtúbulos da célula mãe e o complexo pelicular interno, desintegram a membrana plasmática intacta, e proporcionam o surgimento das células-filhas (fig. 7).

Os ciclos endodiogênicos procedem de uma ampliação da rede intravacuolar, que por sua vez, promove um espaço entre as células-filhas (Magno *et al.*, 2005). Os parasitas, dentro do vacúolo, ficam conectados a um corpo residual por sua porção final e a cada outro por túbulos da rede intravacuolar. Os túbulos estabelecem conexões entre cada parasita-filho, conservando a sua disposição dentro do vacúolo (Magno *et al.*, 2005).



**Figura 7-** Representação esquemática dos diferentes estágios de divisão do taquizóito (modificado Kepca & Scholtyseck, 1970). APA: anel polar apical; C: conóide; M: micronemas; R: rôptrias; MP: membrana plasmática; CPI: complexo pelicular interno; N: núcleo; APP: anel polar posterior.

### 1.3.5- Liberação dos parasitas

A liberação do parasita pela célula hospedeira é ainda pobremente estudado. Muitos pesquisadores assumem que a saída do *T. gondii* está simplesmente ligada à ruptura mecânica da célula hospedeira.

Entretanto, estudos evidenciam que o fenômeno da liberação do *T. gondii* é semelhante ao processo de invasão (Endo *et al.*, 1982; Black & Boothroyd, 2000). A liberação do parasita, é dependente de mobilidade e é regulada por uma via de transdução de sinal dependente de cálcio (Hoff & Carruthers, 2002). Em adição, a saída do parasita pode ser estimulada por agentes redutores (Stommel *et al.*, 1997).

Parasitas intracelulares possuem a habilidade de monitorar a viabilidade da célula hospedeira e se por acaso sua aptidão for comprometida, o parasita sairá e invadirá células vizinhas.

O processo de liberação é um evento crucial no ciclo intracelular do *T. gondii* devido à precedente morte da célula hospedeira e liberação dos parasitas, proporcionando um recomeço no ciclo da invasão.

Com a lise celular, o nível de potássio ( $K^+$ ) no citoplasma da célula hospedeira fica rapidamente menor, com isso há uma ativação da fosfolipase C (PLC) do parasita, levando a um aumento no nível de cálcio citoplasmático **(Bi et al., 1997; Moudy et al., 2001)**. Um dos efeitos cruciais produzidos por essa elevação é a extrusão do conóide e a secreção de micronemas. Uma proteína quinase dependente de cálcio, a  $Ca^{2+}$  calmodulina, denominada em *T. gondii*, TgCDPK1 é potencialmente implicada na transdução de sinal levando a secreção da organela **(Kieschnick et al., 2001)**.

Interessantemente, o estoque de cálcio intracelular no parasita, incluindo, RE, mitocôndria e ácidocalcisoma **(revisado em Moreno & Docampo, 2003)**, tem mostrado regular a secreção de micronemas e iniciar a mobilidade do *T. gondii* **(Lovett & Sibley, 2003)**. Por outro lado, **Monteiro et al., 2000**, mostram que ionóforos de cálcio são particularmente ativos em induzir a destruição dos taquizoítos extracelulares.

#### **1.4- Drogas anti-proliferativas**

Devido ao interessante comportamento biológico, no que diz respeito ao processo invasivo e replicativo do *T. gondii*, estudos com drogas citotóxicas que atingem o vacúolo parasitóforo do *T. gondii* tem sido realizados. Drogas citotóxicas exercem seus efeitos no ciclo celular, sendo específicos de fase (agente fase específica) ou não (agentes não específicos de fase) **(Hoagland, 1992)**.

Alguns compostos têm sido utilizados contra o *Toxoplasma gondii*, mas somente poucos são efetivos. No entanto os compostos disponíveis utilizados acarretam vários efeitos colaterais em pacientes imunodeprimidos, transplantados ou aqueles que fazem o uso de quimioterápicos **(Bosch-Driessen et al., 2002; Degerli et al., 2003)**. Além disso, a mesma terapia, sulfonamida e pirimetamina **(Tenant-Flowers et al., 1991)** mata eficientemente o estágio taquizoíto do *T. gondii*, porém, não remove cistos teciduais, possivelmente devido ao reduzido tempo de tratamento.

Dessa forma, se faz necessário o estudo de drogas ou compostos mais potentes e menos tóxicos para o progresso do tratamento da Toxoplasmose. Isso implica num grande conhecimento da biologia do parasita para determinar novos alvos quimioterápicos.

A propósito, o presente trabalho utilizará novos compostos sintéticos da classe das Tiosemicarbazonas, bem como seus derivados Tiazolidinônicos contra o desenvolvimento intracelular do *T. gondii*.

#### 1.4.1- Tiosemicarbazonas

Tiosemicarbazonas (TSC) são de considerável importância devido as suas propriedades químicas e potenciais atividades biológicas, tais como: antitumoral, antibacteriana, antiviral e antiprotozoária (**Bharti et al., 2003; Silva et al., 1998**). TSCs são compostos geralmente obtidos pela condensação de tiosemicarbazidas com aldeídos e cetonas e recebem a denominação da classe após o nome do respectivo aldeído ou cetona condensado (**fig. 8**). As tiosemicarbazidas podem ser adquiridas comercialmente ou obtidas por síntese química (**Bharti et al., 2002**), porém, no presente trabalho ácido tioglicólico foi utilizado para preparar as tiosemicarbazidas (**fig.9**).

TSC e seus derivados são também conhecidos por suas propriedades de formar complexos com íons metálicos, comportando-se como agentes quelantes (**Casas et al., 2000**). Essa propriedade de formar quelatos com íons metálicos (**Bharti et al., 2003; Kasuga et al., 2003**) é responsável pela atividade antiparasitária, testada contra protozoários cavitários -*Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*- (**Bharti et al., 2002**). No entanto, pouco se sabe da ação desses compostos sobre o *Toxoplasma gondii* em desenvolvimento no interior da célula hospedeira. Além disso, tais propriedades são também responsáveis pelas atividades biológicas antiplasmódica, extras e intracelulares (**Walcourt et al., 2004**), antitripanossoma e antileishmania extracelulares (**Casero et al., 1980; Dood et al., 1989**).

Em nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que Hidroxiuréia, um composto pertencente à classe das Tiosemicarbazonas, inibe o

desenvolvimento e multiplicação do *T. gondii*, *Leishmania amazonenses* e *Trypanosoma cruzi* intracelulares (Melo *et al.*, 2000; Melo & Beiral, 2003).

#### 1.4.2- Derivados Tiazolidinônicos (4-Tiazolidinônicos)

As Tiazolidinonas são derivados carbonilados das tiazolidinas e tiosemicarbazonas. Esses compostos são também bastante importantes na indústria farmacológica, devido também às suas potenciais atividades biológicas como antiprotozoários (Alves *et al.*, 1993), antibacterianas (Gürsoy *et al.*, 1997; Khawass *et al.*, 1989), fungicidas (Liu *et al.*, 2000), entre outras. A ação desses derivados não foi ainda extensivamente estudada quanto a susceptibilidade dos protozoários parasitas, contudo, trabalhos relacionados a outros tipos de infecção por microrganismos mostram resultados farmacológicos potenciais deste núcleo químico (Khawass *et al.*, 1989, Küçükgüzel *et al.*, 2002).

#### 1.4.3- Mecanismo de ação das Tiosemicarbazonas e de seus derivados Tiazolidinônicos

Devido sua propriedade de formar quelatos com íons metálicos entre eles, o Ferro, (Bharti *et al.*, 2003; Kasuga *et al.*, 2003) as tiosemicarbazonas atuam inibindo a incorporação de H<sup>3</sup>-timidina no DNA, impedindo, entre outras, a atividade da enzima ribonucleotídeo redutase -RNR- (Finch *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 1970). Na ausência de Ferro as células não podem passar da fase G1 para fase S do ciclo celular, sendo a inibição da RNR um fator limitante na síntese de DNA.

A enzima ribonucleotídeo redutase, possui um papel central na síntese de desoxirribonucleotídeo requerido para a replicação e reparo do DNA (Thelander & Reichard, 1979; Cory & Sato, 1983), desempenhando uma forte correlação entre a atividade da enzima e a proporção da replicação (Elford *et al.*, 1970; Weber, 1983). As RNRs comportam-se particularmente como um alvo atrativo para agentes neoplásicos direcionados contra um rápido crescimento em tumores. A enzima é composta por duas subunidades

diméricas protéicas, conhecidas como, M1 e M2. O núcleo catalítico da subunidade M2 contém um radical livre Tiroxil que está estabilizado por um Ferro central (não-heme). Ambos, o Ferro e o grupo Tiroxil, são essenciais para a atividade catalítica da RNR.

Compostos com a função de desestabilizar o Ferro central, inativando com isso a atividade enzimática tem sido identificados. Hidroxiuréia é um desses compostos, entretanto, a mesma possui uma baixa afinidade pela enzima **(Krakoff, 1975)**, uma meia-vida baixa em seres humanos **(Beckloff et al., 1965)** e uma das limitações de sua terapia é o desenvolvimento de resistência que ocorre muitas vezes via diferentes mecanismos envolvendo mudanças qualitativas e quantitativas na RNR **(Moore & Hurlbert, 1989; Donehower, 1996)**.

Diferentemente da Hidroxiuréia, os novos compostos recém sintetizados, as Tiosemicarbazonas e seus derivados Tiazolidinônicos, possuem uma alta afinidade pela enzima **(Finch et al., 1999)**. Assim, esses novos compostos poderão contribuir para um melhor tratamento na quimioterapia do câncer e a propósito desse trabalho, contribuir também para o possível tratamento de algumas doenças parasitárias, atuando no desenvolvimento e replicação dos parasitas intracelulares como, em questão, o *Toxoplasma gondii*.

## *Objetivos*

## 2- OBJETIVOS

### 2.1- Geral

Analisar o desenvolvimento intracelular do *Toxoplasma gondii*, após o tratamento com os compostos anti-proliferativos Tiosemicarbonas e seus derivados Tiazolidinônicos

### 2.2- Específicos

- Verificar o efeito citotóxico dos compostos através de um “screening” de concentrações sobre o desenvolvimento intracelular do parasita, a fim de estabelecer a concentração padrão, indicada para todos os compostos, ou seja a mais significativa.

- Estabelecer dados quantitativos, onde será avaliado:

- % do número de células infectadas e não infectadas;
- Média do número de parasitas normais e alterados;
- VP que contém normais e alterados.



- Avaliar se alterações nas estruturas químicas dos compostos influencia em seu modo de ação.

-Verificar, se na ausência dos compostos à infecção com o *T. gondii* é revertida após prévia incubação.

- Analisar a morfologia e ultraestrutura do parasita, bem como da célula hospedeira, após o tratamento com os compostos anti-proliferativos.

# *Materiais e Métodos*

## **3-MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1- A Célula Hospedeira**

O modelo de célula hospedeira que foi utilizado neste trabalho constitui uma linhagem celular estabelecida e muito empregada em diversos estudos da área biológica – a célula Vero. Essas células são fibroblastos de rim de macaco verde africano, uma linhagem celular estabelecida muito empregada em diversos estudos na área biológica. São células que se apresentam em populações homogêneas, não são células fagocíticas profissionais, promovem uma ótima aderência em substrato sólido, são ricas em organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. É importante ressaltar que células Vero suportam longos períodos de infecção com taquizoítos de *T. gondii*, não sofrendo aparentemente drásticas mudanças morfológicas. Devido a essas características, essa linhagem celular tem se mostrado um ótimo modelo de célula hospedeira para o estudo de interação com o *Toxoplasma gondii*.

Culturas de células Vero foram mantidas em garrafas plásticas (25 cm<sup>2</sup>) usando meio 199 (SIGMA), pH 7.2, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO) até alcançarem o estágio de monocamada. Após esse estágio, foram lavadas com 3 mL de PBS (SIGMA) estéril por 2 vezes. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de tripsina verseni bovina, 0,25% (SIGMA) a cultura por aproximadamente 30 segundos. Cinco milímetros (5 mL) de meio 199 contendo 5% de SFB foram adicionados à cultura tripisinizada. Aproximadamente  $2 \times 10^5$  células foram distribuídas em placas de 24 poços (microscopia óptica) ou  $2 \times 10^6$  em garrafas plásticas de 75 cm<sup>2</sup> (microscopia eletrônica de transmissão) e posteriormente, incubadas por 24h em estufa 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.2- Obtenção dos parasitas**

Taquizoítos de *T. gondii*, cepa RH (cepa virulenta), foram mantidos por passagem na cavidade peritoneal de camundongos a cada 48h. Após esse

tempo, os camundongos foram mortos por CO<sub>2</sub>. Na cavidade peritoneal dos camundongos, foram injetados 3 mL de PBS, pH 7.2. O esudato foi então reunido e utilizado em camundongos sadios ou retirados para o processo experimental. O esudato retirado para o processo experimental foi centrifugado a 1200 rpm por 10 min. Foi realizado teste de viabilidade dos taquizoítos com azul de tripan 0,4% (SIGMA).

### **3.3- Interação do parasita com a célula hospedeira**

Como mencionado anteriormente, as culturas de células Vero, após passarem pelo processo de tripsinização, foram distribuídas em placas de culturas de 24 poços, para microscopia óptica ou em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> para microscopia eletrônica de transmissão, sendo posteriormente incubadas em estufa por 24h, 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

Após a incubação, a placa ou garrafa contendo as células aderidas foi observada ao microscópio invertido Axioplan Zeiss e a contagem do número de células foi realizada utilizando objetiva 20X. Os parasitas retirados de camundongos anteriormente infectados foram centrifugados a uma rotação de 1200 rpm/10 min e ressuspensos em 1mL de PBS. Em seguida, 0,1 mL da amostra foi retirada para contagem na câmara de Neubauer, utilizando microscópio Axioplan Zeiss, objetiva 40X. O volume calculado de parasitas foi acrescentado na proporção de 10 parasitas para cada célula e incubados em estufa 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Depois de 24h de interação com os parasitas, as culturas foram incubadas com as Tiosemicarbazonas e seus derivados Tiazolidinônicos a uma concentração de 1,5 mM, por 12h, 24h e 48h a 37°C, para microscopia óptica e por 24h, para microscopia eletrônica de transmissão. O controle do processo experimental foi célula infectada e não tratada. Para a análise da reversibilidade o controle foi, células infectadas e tratadas. Depois do tratamento, as culturas foram lavadas com PBS e processadas para microscopia óptica e eletrônica de transmissão.

### **3.4- Ação biológica dos compostos (citotoxicidade)**

Através de um teste com diferentes concentrações, que variou entre 0,1 mM e 30 mM (0.1 mM, 1 mM, 1,5 mM, 10 mM, 20 mM e 30 mM), utilizando o mesmo procedimento mencionado acima, foi possível estabelecer a concentração mais significativa e utilizada para os compostos, além de estabelecer também o coeficiente de inibição de infecção (IC<sub>50</sub>). A concentração mais significativa foi aquela em que na sua presença não foi possível verificar danos aparentes nas células hospedeiras e ao mesmo tempo foi possível observar severos danos nos parasitas no interior da célula hospedeira. Através desse teste, foi possível avaliar o grau de toxicidade dos compostos testados nas diferentes concentrações.

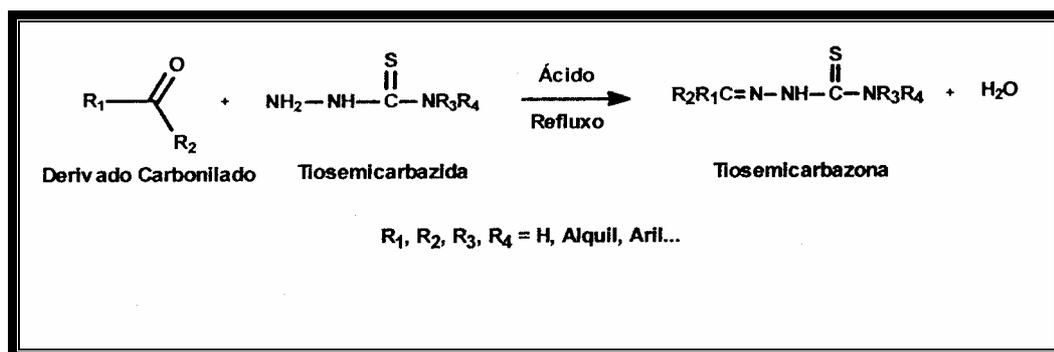
### **3.5- Compostos/Síntese**

As Tiosemicarbazonas e seus derivados Tiazolidinônicos foram sintetizadas no Departamento de antibióticos e também no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, e foram cedidas para posterior análise no nosso laboratório, onde foi possível verificar a ação dos compostos sobre diferentes aspectos do desenvolvimento intracelular do *T. gondii*. Os compostos foram dissolvidos em Dimetil Sulfóxido (DMSO) (Merck) e incubado em meio 199 (SIGMA) para uma concentração final de 1,5 mM. As culturas foram tratadas por 12h, 24h e 48h e incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. A concentração utilizada, como já mencionado, baseou-se em estudos obtidos através de um “screening” de diferentes concentrações, onde pode ser observada e utilizada a concentração mais significativa para cada composto.

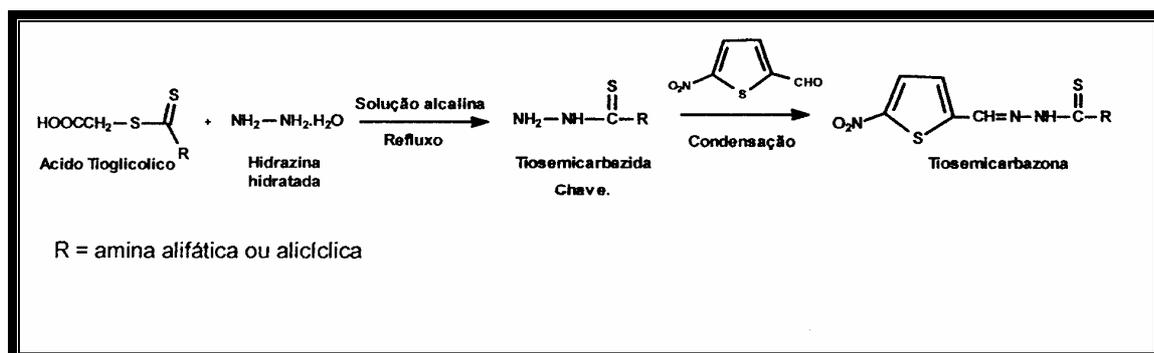
Vinte e quatro novos compostos de Tiosemicarbazonas foram utilizados no decorrer do presente trabalho, sendo doze derivados Tiosemicarbazonas e doze derivados Tiazolidinônicos, estes últimos foram sintetizados a partir das Tiosemicarbazonas.

A síntese das TSCs se dá através da condensação equimolar de um derivado carbonilado, do tipo aldeído ou cetona, com tiosemicarbazidas em

meio alcoólico sob refluxo e quantidades catalíticas de ácido (**Akinchan et al., 2002; Easmon et al., 1992**) (fig. 8). Ácido tioglicólico, como já mencionado, foi utilizado para preparar as tiosemicarbazidas pela reação com hidrazina hidratada em solução alcalina sob refluxo. Estas foram posteriormente condensadas com derivados de aldeído substituídos para se obter as TSCs (fig. 9).



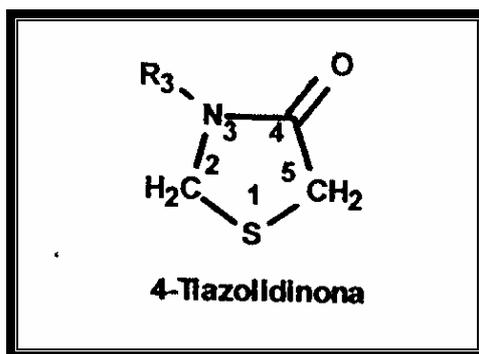
**Figura 8:** Reação de formação das Tiosemicarbazonas



**Figura 9:** Utilização de ácido tioglicólico na preparação de tiosemicarbazonas

Por outro lado, os derivados Tiazolidinônicos utilizados neste trabalho, foram sintetizados a partir da reação de ciclização entre as Tiosemicarbazonas e anidrido maléico em solução contendo tolueno seco ou benzeno sob refluxo (**Brown, 1961**).

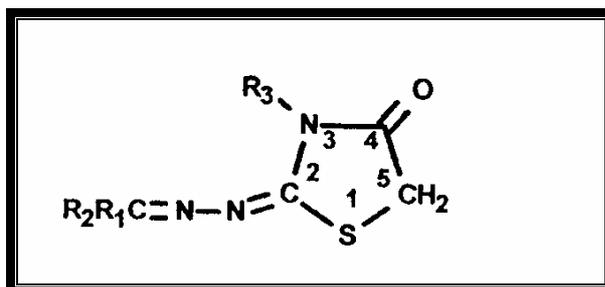
Suas estruturas químicas apresentam-se formadas por um anel de cinco membros, contendo dois heteroátomos: um enxofre (**S**) e um nitrogênio (**N**) e um grupo carbonila na posição 4. A numeração para nomenclatura desses compostos inicia-se com o enxofre recebendo a designação inicial número 1, enquanto o nitrogênio recebe a numeração 3, como demonstrado na **figura 10**.



**Figura 10-** Numeração do núcleo de 4-Tiazolidinonas

As outras posições do anel, **2** e **5**, podem ser substituídas por diversos grupos químicos em geral.

As Tiazolidinonas, derivadas de tiosemicarbazonas, utilizadas neste trabalho, apresentam na posição 2, o grupo hidrazona condensado (**Brown, 1961**) (**fig. 11**).



**Figura 11-** 4-Tiazolidinona derivado de Tiosemicarbazona.

Diferentes radicais foram utilizados na síntese das Tiosemicarbazonas e de seus derivados Tiazolidinônicos. Na porção benzilideno, foram primeiramente utilizados os radicais: cloro, hidrogênio e grupo nitro (**fig.12**).

No presente trabalho, porém, todos os compostos utilizados apresentam o grupo nitro (NO<sub>2</sub>) como substituinte, devido a esses derivados apresentarem os maiores valores de redução observados nos prévios ensaios (**fig.12**). Seguindo esse raciocínio, o espectro das moléculas foi ampliado com a inclusão do grupo nitro nas posições orto, meta e para no anel aromático, para substituir o R<sub>1</sub> e os grupos H ou CH<sub>3</sub> ou CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub> ou C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, para substituírem o R<sub>2</sub> (**fig.13**).

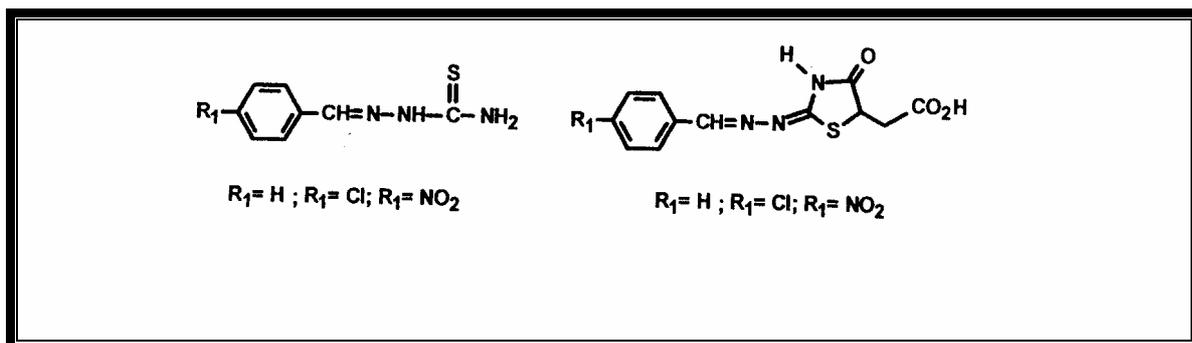


Figura 12: Tiosemicarbazona e derivados Tiazolidinonas previamente preparados

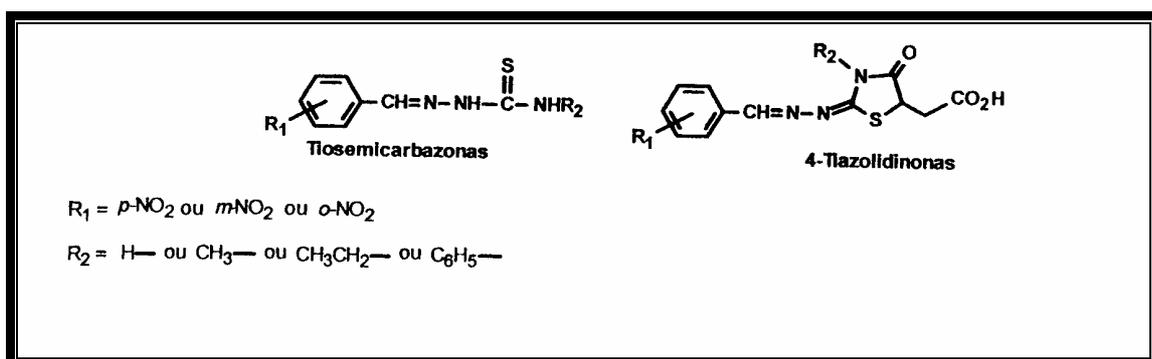


Figura 13: Moléculas alvo

Devido ao fato dos derivados Tiazolidinônicos serem sintetizados a partir das Tiosemicarbazonas, tais compostos foram nomeados da seguinte maneira: nomenclatura de número 3 para Tiosemicarbazonas (**fig.14**) e nomenclatura de número 4 para os seus derivados Tiazolidinônicos (**fig. 15**).

Além disso, como demonstrado na **figura 14 e 15**, os grupos Tiosemicarbazonas e seus derivados Tiazolidinônicos, respectivamente, foram divididos em 4 grupos de 3 compostos para cada série. Dentro das Tiosemicarbazonas e de seus derivados Tiazolidinônicos, um grupo se diferencia do outro pela presença de diferentes radicais substituindo o  $R_2$ , que como já mencionado, são: H,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$  e  $\text{C}_6\text{H}_5$  (**círculos**) e um composto se diferencia do outro dentro de cada grupo, pela localização do grupo  $\text{NO}_2$ , ora na posição **para** ( $p\text{-NO}_2$ ), ora **orto** ( $o\text{-NO}_2$ ), ora **meta** ( $m\text{-NO}_2$ ), substituindo o radical  $R_1$  (**círculos**).

Os números 3 e 4, referentes aos Derivados Tiosemicarbazonas e os Derivados Tiazolidinônicos respectivamente (**fig. 14 e fig.15**), se deve ao processo de síntese dos compostos, onde os Derivados Tiosemicarbazonas, serviram de base para síntese dos Derivados Tiazolidinônicos.

## TIOSEMICARBAZONAS

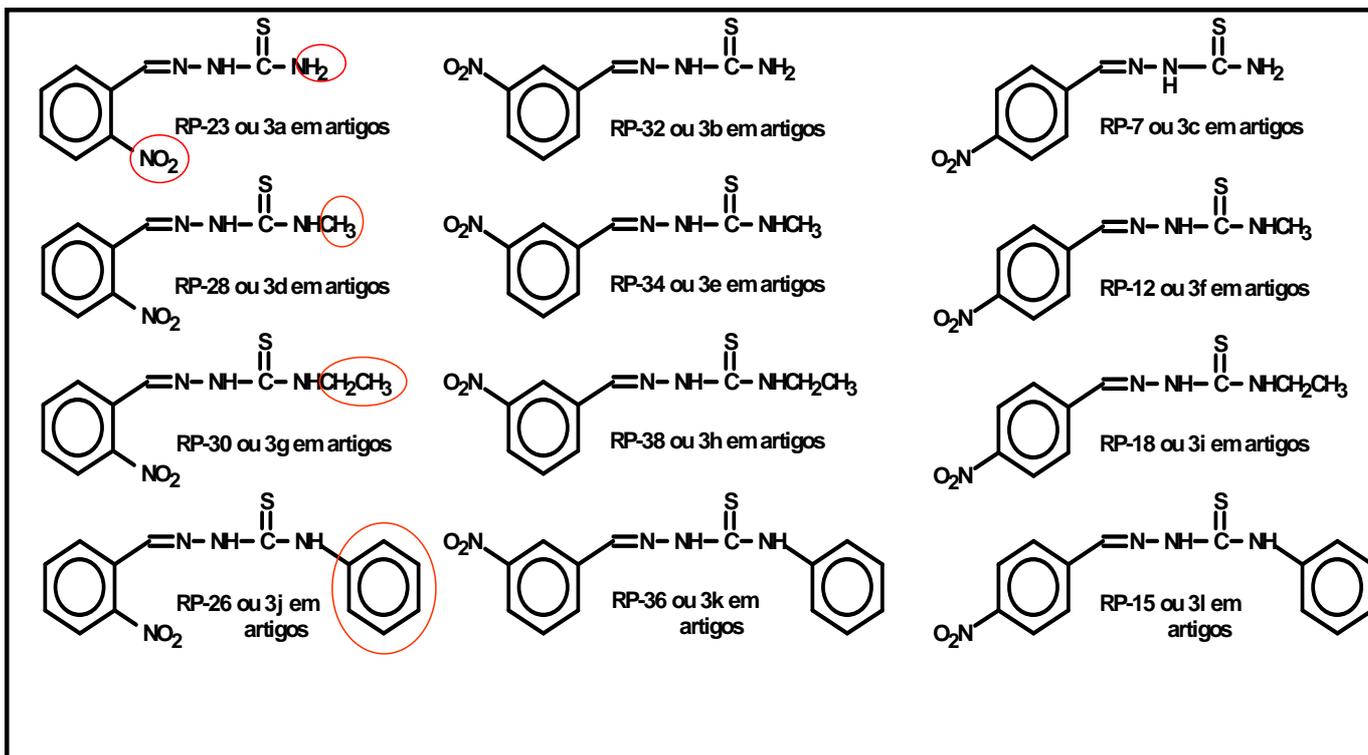


Figura 14: Estrutura química das Tiosemicarbazonas

## DERIVADOS TIAZOLIDINÔNICOS

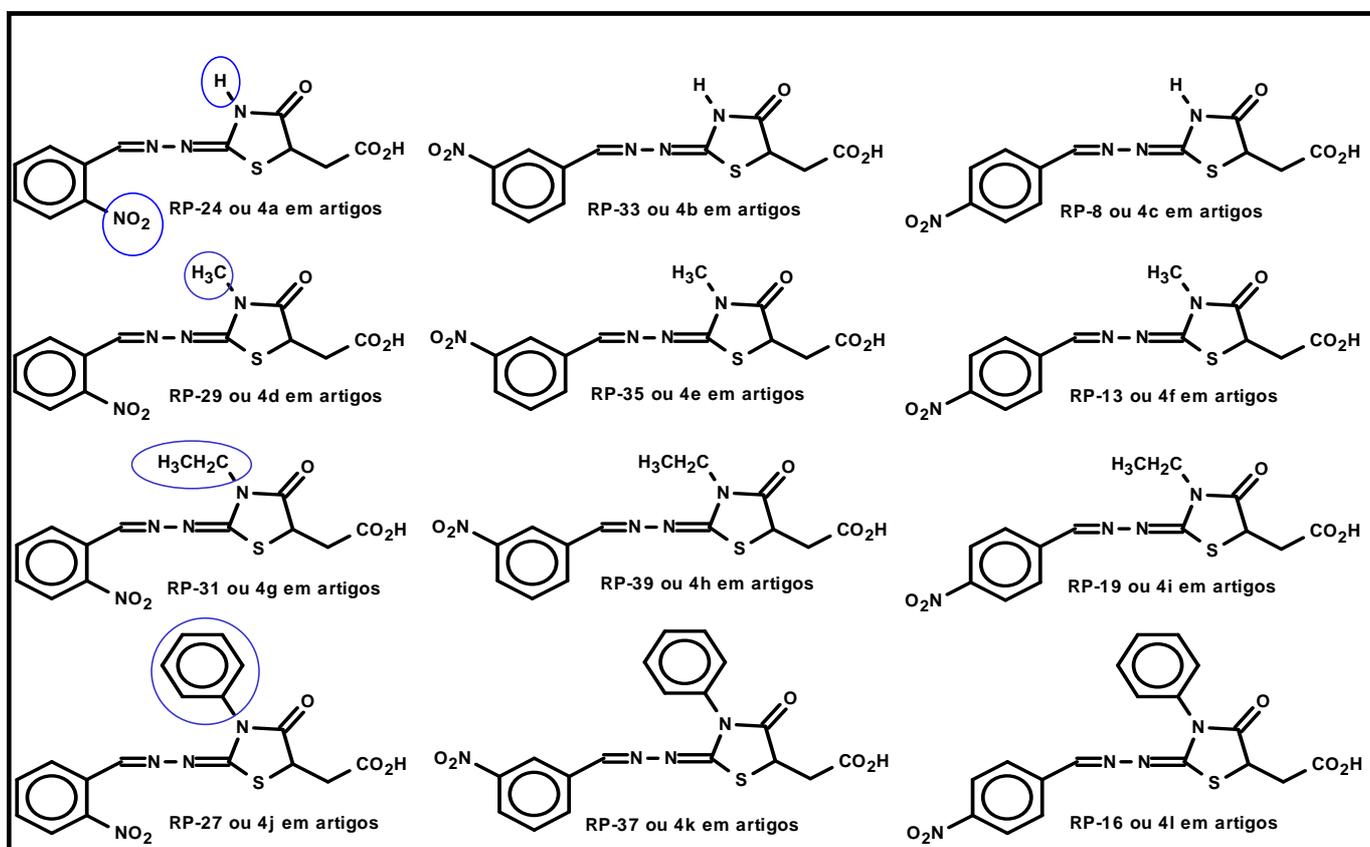


Figura 15: Estrutura química dos derivados Tiazolidinônicos

De acordo com a retirada ou inserção de radicais nas estruturas químicas das TSCs, a potencialidade desses compostos poderá ser afetada.

### **3.6- Análise quantitativa**

Após o processamento do material para microscopia óptica em todos os tempos de incubação com os compostos, foi feita uma análise quantitativa a fim de verificar: a porcentagem de células infectadas e não infectadas, a média do número de parasitas normais e destruídos ou em processo de destruição e também a média dos vacúolos parasitóforos que os contém. A análise quantitativa foi efetuada por meio da contagem de campos aleatórios no microscópio óptico utilizando lente objetiva de 40x

### **3.7- Análise da reversibilidade**

A reversibilidade dos compostos foi analisada em culturas infectadas com taquizoítos de *T. gondii*, incubada por 24h com os compostos **3f** e **4f** que apresentarem resultados mais significativos. Após o tempo de incubação por 24h, o meio com o composto foi removido da cultura e substituído por meio 199 sem o composto. As células foram incubadas por mais 24h e observadas por microscopia óptica.

### **3.8- Microscopia Óptica**

Células Vero incubadas previamente por 24h a 37°C foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* por 24h. Posteriormente foram incubadas com os 24 compostos: Doze derivados Tiosemicarbazonas - (**RP-23 ou 3a; RP-32 ou 3b; RP-07 ou 3c; RP-28 ou 3d; RP-34 ou 3e; RP-12 ou 3f; RP- 30 ou 3g; RP-38 ou 3h; RP-18 ou 3i; RP-26 ou 3j; RP-36 ou 3k; RP-15 ou 3l**), doze derivados Tiazolidinônicos – (**RP-24 ou 4a; RP-33 ou 4b; RP-08 ou 4c; RP-29 ou 4d; RP-35 ou 4e; RP-13 ou 4f; RP-31 ou 4g; RP-39 ou 4h; RP-19 ou 4i; RP-27 ou 4j; RP-37 ou 4k; RP-16 ou 4l**) por 24h.

Posteriormente, os derivados Tiosemicarbazonas, **3g**, **3e**, **3d**, foram incubados por 12h, sendo, **3g**, **3e**, também incubados por 48h. Os derivados Tiazolidinônicos, **4b**, **4f**, **4e**, foram também testados por 12h, e os compostos **4b**, **4f**, por sua vez foram testados por 48h.

Células Vero infectadas, tratadas e não tratadas com as drogas anti-proliferativas, foram lavadas com PBS, pH 7,2 por 3 vezes e fixadas com reagente Bouin (71% de ácido pícrico, 5 % de ácido acético e 24% de formol) por 5 min, a seguir foram lavadas com PBS por 4 vezes pH 7,2, 28°C.

Lamínulas contendo as células fixadas foram coradas em solução de Giemsa (1:10) em água destilada por 2 horas e lavadas 2 vezes com água destilada. Após a coloração, as culturas foram desidratadas com rápidas lavagens na bateria acetona/xilol: • Acetona pura (2 vezes); • Mistura 1 (acetona-xilol 9:1); • Mistura 2 (acetona-xilol 7:3); • Mistura 3 (acetona-xilol 3:7) e • Xilol puro.

As lamínulas foram montadas sobre uma lâmina histológica, utilizando Entellan<sup>R</sup> e incubadas na estufa 50°C por 24h.

O material foi observado e analisado quantitativamente em campo claro no microscópio ótico Axioplan-Zeiss, utilizando objetiva de 40X.

### **3.9- Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Células Vero cultivadas em garrafas de plástico incubadas por 24h a 37°C infectadas e não infectadas com taquizoíta de *T. gondii* por 24h, foram incubadas por 12h e 24h, com o compostos **3I** (derivado Tiosemicarbazona) e por 24h com o composto **4I** (derivado Tiazolidinônico), sendo posteriormente observadas no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900.

As células foram lavadas 3 vezes com PBS, após foram fixadas em formaldeído 4%, glutaraldeído 1%, tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2, Cloreto de cálcio 5 mM e 5% de sacarose (SIGMA) por 1 h. Após a fixação as células foram lavadas com solução tampão cacodilato e 5% de sacarose e removidas por raspagem, utilizando bastão de extremidade de látex.

A suspensão contendo as células fixadas foi centrifugada a 2100 rpm/10 min. O sedimento formado foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 2% (SIGMA) e

ferrocianeto de potássio (SIGMA) por uma hora a temperatura ambiente, ausente de luz. Posteriormente à fixação, as células foram centrifugadas 2100 rpm/10 min e lavadas com tampão cacodilato e 5% de sacarose. Após essa etapa as células foram centrifugadas 2100 rpm/10 min e ressuspensas em acetona para desidratação na seguinte ordem: acetona 30% por 10 min; acetona 50% por 10 min; acetona 70% por 10 min; acetona 90% por 10 min; acetona 100% por 10 min (3 vezes).

O sedimento foi incubado em resina epon-acetona 100% na proporção 1:1 overnight. A solução epon-acetona foi substituída por epon puro por 6 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi incluído em eina epóxi e polimerizado em estufa 60°C por 48 horas.

Os blocos foram recortados no Reichert ultratrin - Leica para formar pirâmides truncadas onde se encontra o material. Cortes ultrafinos foram obtidos no ultramicrotomo Reichert Ultracuts - Leica e coletados em grades com 200-400 tramas por polegada (200-400 *mesh*). Para constratação dos cortes, foram utilizados acetato de uranila (5% por 20 min) e citrato de chumbo (5 min). O material foi observado no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900, operando a 80 kV.

## *Resultados*

## 4- RESULTADOS

### 4.1- Ação biológica dos compostos (citotoxicidade)

Para determinar a concentração mais efetiva contra os parasitas intracelulares, que ainda preserva as células hospedeiras, diferentes concentrações de tiosemicarbazonas e de seus derivados foram testadas. A faixa de concentração variou de 0,1 mM à 30 mM, com as seguintes concentrações: 0,1 mM, 1 mM, 1,5 mM, 10 mM, 20 mM e 30 mM. A concentração utilizada no tratamento foi aquela que na incubação por 24h não promoveu alterações nas células hospedeiras presentes na cultura, ficando as mesmas com sua morfologia aparentemente normal e aderida ao substrato.

Foi possível também estabelecer o coeficiente de inibição de 50% de infecção pelos parasitas (IC<sub>50</sub>).

A **tabela 1** apresenta os resultados obtidos para 10 compostos de tiosemicarbazonas (3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i, 3j, 3k) e 4 compostos derivados tiazolidinônicos (4b, 4c, 4d, 4i). Em relação à porcentagem de células infectadas, o IC<sub>50</sub> para quase todos os compostos testados foi  $\leq 2,5$  mM, com exceção somente do composto **3f**, que apresentou IC<sub>50</sub> de 10 mM.

A toxicidade dos compostos foi mais efetiva contra os parasitas intracelulares, apresentando IC<sub>50</sub> de 0,5 mM, com exceção dos compostos 3b (0,1 mM), 3f (3 mM) 3h e 3k (0,08 mM).

A concentração mais efetiva para todos os compostos foi a de 1,5 mM. Na presença dessa concentração, os parasitas intracelulares apresentaram bastante alterações relacionadas principalmente com a sua forma e as células hospedeiras, no entanto, encontravam-se aparentemente normais aderidas ao substrato. A partir daí, todos os tratamentos realizados no presente trabalho seguiram essa mesma concentração de 1,5 mM.

Ressalta-se, portanto que, devido a similaridade apresentada pelos tratamentos com os compostos em prévios ensaios, somente alguns compostos foram demonstrados nesta análise. Isso vale também para as demais análises apresentadas.

**Tabela 1:** Valores do IC<sub>50</sub> referente ao número de células e ao número de parasitas intracelulares dos diferentes compostos pertencentes às duas séries.

<b>Compostos</b>	<b>% de células infectadas</b>	<b>Parasitas intracelulares</b>
	<b>IC<sub>50</sub> (mM)</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mM)</b>
<b>Derivados Tiosemicarbonas</b>		
3b	2± 0.05	0.1±0.06
3c	1.5±0.05	0.5±0.06
3d	2±0.06	0.5±0.05
3e	1.5±0.04	0.5±0.05
3f	10±1	3±0.4
3g	2±0.05	0.5±0.05
3h	1±0.05	0.08±0.002
3i	2.5±0.05	0.5±0.05
3j	1±0.05	0.5±0.05
3k	1±0.05	0.08±0.004
<b>Derivados Tiazolidinônicos</b>		
4b	2±0.05	0.5±0.06
4c	2.5±0.04	0.5±0.04
4d	2±0.07	0.5±0.06
4i	2±0.06	0.5±0.06

## 4.2- Análise quantitativa: Tiosemicarbonas/Derivados Tiazolidinônicos

Diante das alterações sofridas pelos taquizoítos intracelulares após o tratamento com as Tiosemicarbonas e com seus derivados Tiazolidinônicos, foi possível verificar o impacto dessas alterações sobre a infecção na célula hospedeira, através da análise quantitativa dos compostos utilizados. Através dessa análise foi possível avaliar após os tratamentos: a % do número de células infectadas, a média do número de parasitas normais e alterados, bem como a dos VP que os contém.

Todos os compostos analisados reduziram a porcentagem de células infectadas após 12h e 24h de tratamento (**tabelas 2 e 3**), sendo que em 24h de incubação, a redução foi mais drástica. No tratamento por 48h, observamos

um grande decréscimo no número de células presentes na cultura, por isso, não foi possível estabelecer dados quantitativos, porém a análise morfológica desse tempo de incubação será avaliada.

Células infectadas tratadas por 24h apresentaram em sua maioria parasitas alterados, entretanto, no tratamento por 12h, é notável uma quantidade maior de parasitas normais no interior do vacúolo parasitóforo.

Na incubação por 48h, não foi possível identificar parasitas no interior do VP, devido a drástica diminuição do número de células. Mesmo nas poucas células presentes na cultura, não foi verificado parasitas intracelulares.

Para verificar a ação desses compostos sob a multiplicação dos parasitas, realizou-se a contagem e a avaliação da morfologia dos parasitas intracelulares nas culturas controle e tratada. Observamos que tanto em 12h de incubação como em 24h de incubação com todos os compostos apresentados, o número de taquizoítos e o número de células infectadas diminuíram quando comparado ao número de parasitas nas culturas infectadas não tratadas (controle) (**tabela 2**). No entanto, no tratamento por 24h a redução foi muito mais drástica (**tabela 3**).

**Tabela 2:** Percentagem do número de células Vero infectadas e o número de parasitas intracelulares após o tratamento por 12h com três derivados Tiosemicarbonas e três com os derivados Tiazolidinônicos. 1- vacúolos com parasitas destruídos.

<b>Compostos</b>	<b>% do número de células infectadas</b>		<b>Média do número de Parasitas intracelulares</b>		<b>Média do número de vacúolos<sup>1</sup></b>	
	<b>Controle</b>	<b>Tratado</b>	<b>Controle</b>	<b>Tratado</b>	<b>Controle</b>	<b>Tratado</b>
<b>Derivados Tiosemicarbonas</b>						
3d	70±5	38±4	625±46	78±25	242±4	62±11
3e	63±1	41±9	592±47	82±24	237±3	54±11
3g	56±1	29±6	539±9	121±23	154±4	28±10
<b>Derivados Tiazolidinônicos</b>						
4b	59±4	33±8	496±4	88±29	151±5	53±8
4e	57±2	41±6	522±56	113±45	228±93	66±12
4f	59±4	29±6	496±4	97±31	151±5	37±8

**Tabela 3:** % do número de células e número de parasitas intracelulares após o tratamento por 24h com compostos das duas séries. Estruturas referentes aos radicais 1 (R1) e 2 (R2) são também evidenciados. 1- vacúolos com parasitas destruídos.

Compostos	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	% de células		Média do numero de parasitas intracelulares		Média do numero de Vacúolos <sup>1</sup>	
			Controle	Tratado	Controle	Tratado	Controle	Tratado
<b>Derivados Tiosemicarbazonas</b>								
3a	-H	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	58±9	10±4	704±117	25±22	307±112	20± 9
3b	-H	<i>m</i> -NO <sub>2</sub>	76±9	4±2	768±142	3±3	342±6	7±4
3c	-H	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>	65±12	5±2	698±94	4±6	340±126	12±7
3d	-CH <sub>3</sub>	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	81±4	9±5	783±84	2±3	318±41	10±5
3e	-CH <sub>3</sub>	<i>m</i> -NO <sub>2</sub>	84±3	9±3	642±92	1±1	298±92	10±3
3f	-CH <sub>3</sub>	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>	89±6	12±4	683±60	72±28	329±12	11±1
3g	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	81±4	8±2	783±84	1±2	318±41	18±2
3h	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<i>m</i> -NO <sub>2</sub>	76±9	7±3	768±142	5±6	342±6	18±8
3i	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>	86±4	17±3	852±140	9±2	406±33	7±2
3j	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	84±3	7±3	642±92	3±2	298±57	7±3
3k	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<i>m</i> -NO <sub>2</sub>	65±15	7±4	442±69	11±12	195±67	8±3
3l	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	60±15	5±4	650±205	7±9	328±87	6±5
<b>Derivados Tiazolidinônicos</b>								
4a	-H	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	82±5	7±3	619±95	1±2	268±74	12±2
4b	-H	<i>m</i> -NO <sub>2</sub>	80±6	15±8	840±116	4±3	350±55	24±13
4c	-H	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>	85±3	16±5	732±69	4±3	382±7	20±7
4d	-CH <sub>3</sub>	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	84±3	15±5	888±143	3±3	318±55	23±8
4e	-CH <sub>3</sub>	<i>m</i> -NO <sub>2</sub>	85±2	11±4	628±74	2±3	295±1	7±3
4f	-CH <sub>3</sub>	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>	87±4	13±6	726±115	2±2	332±74	9±5
4g	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	86±4	14±5	663±16	3±2	332±42	22±8
4h	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<i>m</i> -NO <sub>2</sub>	85±3	19±5	732±69	3±2	382±7	19±5
4i	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>	80±2	7±4	627±81	2±2	265±63	12±6
4j	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	83±4	8±3	687±103	2±2	297±38	12±6
4k	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<i>m</i> -NO <sub>2</sub>	72±22	3±4	786±79	2±2	344±60	16±6
4l	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>	83±3	6±2	654±98	1±1	333±4	11±4

A redução do número de VP indica que os parasitas alterados morfológicamente não foram capazes de se multiplicar. Dessa forma, vacúolos parasitóforos com parasitas normais e alterados foram observados e contados após o tratamento por 12h e 24h (**tabelas 2 e 3**). Verificamos também, que no

tratamento por 12h a presença de vacúolos com parasitas normais foi bem maior que no tratamento por 24h. Ademais, a presença de vacúolos com parasitas em processo de destruição, mesmo que inicial, também foi maior no tratamento por 12h, mostrando sua equivalência com a maior porcentagem de células infectadas nesse tempo de incubação (**tabelas 2 e 3**).

Ressalta-se ainda que, apesar de no tratamento por 24h, ter apresentado um número menor de vacúolos com parasitas alterados, os parasitas neles presentes encontravam-se em sua maioria bastante alterados, ou mesmo totalmente destruídos (**tabela 3**). Esses dados equivalem também ao número menor de células infectadas apresentadas no tratamento.

#### **4.3- Influência da estrutura química no mecanismo de ação dos compostos**

A **tabela 3** demonstra, portanto, que as modificações químicas dos diferentes compostos tiveram pouca influência sobre os diferentes aspectos avaliados.

No entanto, podemos constatar que todos os compostos agiram de forma eficiente em diminuir a % de células infectadas, reduzirem o número de parasitas intracelulares, bem como o número de vacúolos parasitóforos.

#### **4.4- Aspectos morfológicos da interação do parasita com a célula hospedeira**

A microscopia óptica foi utilizada para analisar a estrutura morfológica do *T. gondii*, bem como sua disposição na infecção e desenvolvimento na célula hospedeira após o tratamento com as Tiosemicarbazonas e seus derivados Tiazolidinônicos.

Primeiramente, como já descrito, foram realizados testes com diferentes concentrações dos compostos das duas séries, para estabelecer a concentração mais adequada para o tratamento, que foi a de 1,5 mM.

Células Vero cultivadas e processadas como descrito anteriormente, foram utilizadas como células hospedeiras no estudo da interação com taquizoítos de *T. gondii*, e observadas ao microscópio óptico de campo claro.

As células infectadas com taquizoítos de *T. gondii* por 24h, apresentam parasitas em seu interior sob forma de meia-lua ou semicírculo assumindo característica de rosácea, dentro do vacúolo parasitóforo (**figs. 1A-B e figs. 3A-B**) encontrando-se também aderida ao substrato (**figs. 1A e 3A**).

Após o tempo de infecção de 24h, as culturas foram tratadas por 12h, 24h e 48h na presença de Tiosemicarbazonas e de seus derivados Tiazolidinônicos.

Todos os compostos, totalizando 24, foram testados por 24h. No entanto, os efeitos morfológicos e ultraestruturais serão demonstrados somente para alguns compostos, devido à similaridade apresentada em seus resultados na incubação por 24h. Além disso, os compostos analisados morfológicamente e ultraestruturalmente, pertencem a diferentes grupos dentro das duas séries.

Nem todos os compostos foram testados nos tempos de incubação de 12h e 48h. Somente 6 foram incubados por 12h, sendo 3 pertencentes aos derivados Tiosemicarbazonas e 3 aos derivados Tiazolidinônicos e 4 compostos foram incubados por 48h, também pertencentes a ambos os derivados. Os compostos apresentados foram avaliados e demonstrados, seguindo o mesmo critério de seleção do tratamento por 24h.

Todos os compostos utilizados causaram alterações na morfologia dos taquizoítos intracelulares, principalmente em relação à sua forma, onde pode ser observado formas arredondadas no tratamento por 12h (fig. 2A-B-C e fig.4 A-B-C) e semelhantes a inclusões citoplasmáticas no tratamento por 24h (**figs. 1C-D-E-F e figs. 3C-D-E-F**). As alterações apresentadas pelo parasita após o tratamento com os compostos de ambas as séries, Tiosemicarbazonas e derivados Tiazolidinônicos foram bastante semelhantes entre si.

As alterações que os parasitas passaram a apresentar após o tratamento com os compostos são bastante visíveis quando comparadas com a forma normal de semi-círculo apresentada na cultura controle.

A partir das alterações sofridas pelos taquizoítos intracelulares após o tratamento por 24h com os compostos, verificou-se o impacto dessas alterações sobre a infecção, realizando a análise quantitativa (**tabela 3**).

#### **4.4.1- Tratamento com as Tiosemicarbazonas**

Após o tratamento por 12h com o compostos 3d (**fig. 2A**), 3e (**fig. 2B**) e 3g (**fig. 2C**), muitos vacúolos apresentam parasitas com fenótipo arredondado (**figs. 2A-B-C**).

Quando incubados por 24h, com os compostos 3c (**fig. 1C**), 3g (**fig. 1D**), 3e (**fig. 1E**) e 3d (**fig. 1F**), os parasitas apresentam-se como inclusões citoplasmáticas, apresentando drásticas alterações morfológicas (**figs. 1C-D-E-F**), entretanto, a célula hospedeira parece aparentemente inalterada nesse tempo de incubação (**figs. 1C-D-E-F**). As alterações foram bastante semelhantes para todos compostos nesse tempo de incubação, por isso foram demonstrados somente os compostos acima citados.

Na incubação por 48h com os compostos 3e (**fig. 5A**) e 3g (**fig. 5B**), são visíveis grandes alterações na célula hospedeira e os taquizoítos mesmo os alterados, não são observados na cultura de modo geral (**figs. 5A-B**). Porém no tratamento com o composto 3g foi possível verificar uma alteração um pouco menor nas células hospedeiras (**fig. 5B**). A cultura durante esse tempo de incubação, encontra-se quase desprovida de células (**figs. 5A-B**), devido a esse fato, foram evidenciados, somente os resultados referentes ao seu estudo morfológico, como mencionado.

Vacúolos com parasitas normais também foram observados após o tratamento com esses compostos, como podemos observar após o tratamento por 12h com os compostos (**fig. 2B**). Contudo, após o tratamento por 24h, a presença desses vacúolos foi menos constante, pois a maioria apresenta parasitas alterados morfolologicamente ou em processo de destruição (**figs. 1C-D-E-F**), o mesmo não acontece com a incubação por 48h, visto que os parasitas de forma geral encontram-se ausentes (**figs. 5A-B**).

Em relação ao comportamento da célula hospedeira diante exposição ao tratamento com os compostos por 12h e 24h, podemos observar que aparentemente na maioria das vezes a mesma se encontra inalterada (**figs.**

**1C-D-E-F e figs. 2A-B-C).** Porém, no tratamento por 48h, grande parte das células na cultura apresenta-se alteradas morfológicamente, além de se notar decréscimo em seu número (**figs. 6A-B**).

#### **4.4.2- Tratamento com os derivados Tiazolidinônicos**

O tratamento com os derivados Tiazolidinônicos, apresenta uma similaridade de resultados, em relação às Tiosemicarbazonas, no que diz respeito ao aspecto morfológico.

Após o tratamento por 12h com os compostos 4b (**fig. 4A**), 4e (**fig. 4B**) e 4f (**fig. 4C**), a maioria dos vacúolos citoplasmáticos encontrados contém parasita com sua forma modificada (fig. 4A-B-C, setas), porém ainda é possível encontrar parasitas com sua forma normal (**fig. 4B**). No entanto, no tratamento por 24h, com os compostos 4b (**fig. 3C**), 4f (**fig. 3D**), 4e (**fig. 3E**) e 4j (**fig. 3F**), os taquizoítos apresentam alterações morfológicas drásticas, perdendo a forma de meia-lua, assumindo um aspecto amorfo, semelhante a inclusões citoplasmáticas (**figs. 3C-D-E-F**).

Em relação às células hospedeiras, nota-se também que aparentemente, na maioria das vezes, não sofreram modificações (**figs. 3C-D-E-F e figs. 4 A-B-C**), assemelhando ao observado com as Tiosemicarbazonas. Contrapondo-se também, com o tratamento por 48h, com os compostos 4b e 4f onde a maioria das células presente mesmo em menor quantidade, encontra-se bem alteradas (**fig. 5C**), os resultados apresentados são referentes ao tratamento com o composto 4f, devido à similaridade apresentada entre os dois compostos. Todavia, os parasitas como no tratamento com as Tiosemicarbazonas, também não foram observados na cultura (**fig. 5C**).

Vacúolos com parasitas normais também foram observados durante o tratamento por 12h com os compostos 4b, 4e (**fig. 4B**), porém no tratamento por 24h, a presença desses vacúolos foi menos constante ou mesmo inexistente (**figs. 3B-C-D-E**).

#### 4.5- Análise da reversibilidade dos compostos

Para avaliar se a retirada dos compostos tiosemicarbazonas e seus derivados tiazolidinônicos, promove uma re-infecção pelos parasitas previamente tratados por 24h, as células infectadas por 24h e incubadas por 24h com os compostos (**figs. 6A-C**), foram posteriormente re-incubadas em somente meio de cultura por mais 24h (**figs. 6B-D**). Nestas condições observou-se que a infecção não foi re-estabelecida no tratamento com o composto 3g (**tabela 4 e figura 6B**). Ou seja, os parasitas não recuperaram sua capacidade infectiva.

A re-infecção só foi observada para as culturas tratadas com o composto 4f, neste caso os parasitas não afetados, voltaram a se dividir, aumentando dessa forma sua quantidade (**tabela 4**). Esses parasitas foram capazes de invadir novas células e formar novos vacúolos parasitóforos, permitindo dessa forma o aumento dos mesmos (**fig. 6D**).

Contudo, aqueles parasitas que foram drasticamente afetados durante o tratamento, não foram capazes de voltar a se replicar na ausência dos compostos.

**Tabela 4:** Análise da reversibilidade dos compostos. As culturas foram primeiramente tratadas por 24h com os compostos e posteriormente incubadas por mais 24h com meio de cultura.

<b>Compostos</b>	<b>% de células infectadas</b>		<b>Parasitas intracelulares</b>		<b>Média do número de vacúolos</b>	
	<b>Controle</b>	<b>Tratado</b>	<b>Controle</b>	<b>Tratado</b>	<b>Controle</b>	<b>Tratado</b>
	<b>Derivado Tiosemicarbazona</b>					
3g	7±4	5±3	0,8±0	1±2	8±4	4±2
	<b>Derivado Tiazolidinônico</b>					
4f	16±6	12±2	3±2	26±2	12±2	31±4

#### 4.6- Aspectos ultraestruturais da interação do parasita com a célula hospedeira

Para análise ultraestrutural, células Vero infectadas com taquizoítos de *T. gondii* foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. Culturas infectadas não tratadas apresentaram taquizoítos normais proliferando dentro do vacúolo parasitóforo, evidenciando o seu núcleo e sua superfície contínua, delimitando todo o parasita (**figs. 7A-B**). A célula hospedeira apresenta aspecto normal com mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático (RE) junto ao vacúolo parasitóforo e também com núcleo bastante evidente (**figs. 7A-B**)

As culturas foram tratadas com os compostos 3I por 12h (**fig. 7C**) e 24h (**fig. 7D**) (derivado Tiosemicarbazona) e 4I por 24h (**figs. 8A-B**) (derivado Tiazolidinônico). Após 12h de tratamento com o composto 3I (derivado Tiosemicarbazona), o citoplasma do parasita apresentou vacuolizações (**fig. 7C**), notando-se dessa forma, uma desestruturação em todo o citoplasma. No entanto, a superfície do parasita mostra-se aparentemente inalterada (**fig. 7C**). Nesse tempo de tratamento, foi possível também identificar vacúolos com parasitas em estágio menos avançado de destruição (**fig. 7**). Nota-se também uma mudança na disposição da membrana do vacúolo parasitóforo (**fig. 7C**).

A incubação por 24h com esse composto, levou a alterações mais drásticas no parasita intracelular, que apresentou um citoplasma vacuolizado e totalmente alterado com a presença de estruturas contendo estruturas semelhantes a restos de membranas (**fig. 7D**). Observa-se também alteração na superfície do parasita, deixando esta de ser contínua (**fig. 7D**) e a membrana vacuolar, encontra-se da mesma forma, alterada em sua disposição (**fig. 7D**). Por outro lado, o citoplasma da célula hospedeira, encontra-se aparentemente inalterado, com a presença de mitocôndrias (M) ao redor do vacúolo (**fig. 7D**).

O tratamento com o composto 4I (derivado Tiazolidinônico) por 24h, também causou sérias alterações nos parasitas intracelulares (**figs. 8A-B**). O aspecto amorfo, apresentado pelos parasitas na análise morfológica, pôde ser confirmado ultraestruturalmente, com os parasitas totalmente alterados dentro do vacúolo parasitóforo, e também apresentando citoplasma bastante

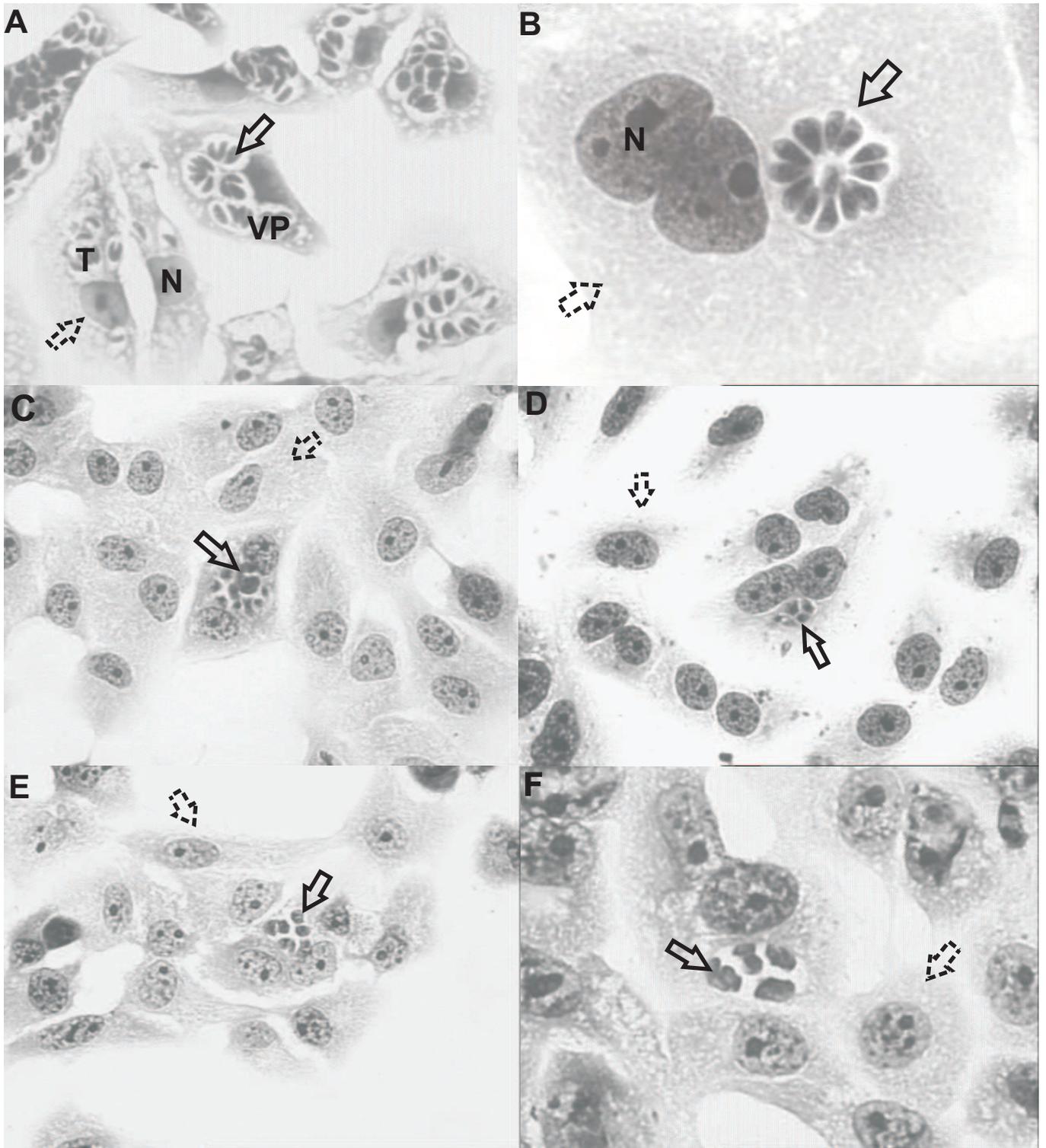
eletrondenso, além de algumas vacuolizações (**figs. 8A-B**). A membrana vacuolar encontra-se também alterada (**figs. 8A-B**).

Analisando a célula hospedeira, verificamos que no tratamento com o composto 3I, a célula aparentemente encontra-se inalterada, com mitocôndrias (M) ao redor do VP (fig. 7D). Porém, após a incubação com o composto 4I, a célula hospedeira, apresentou algumas modificações, como, citoplasma bastante denso, com algumas vacuolizações, além de alterações também na disposição das organelas citoplasmáticas (**figs. 8A-B**).

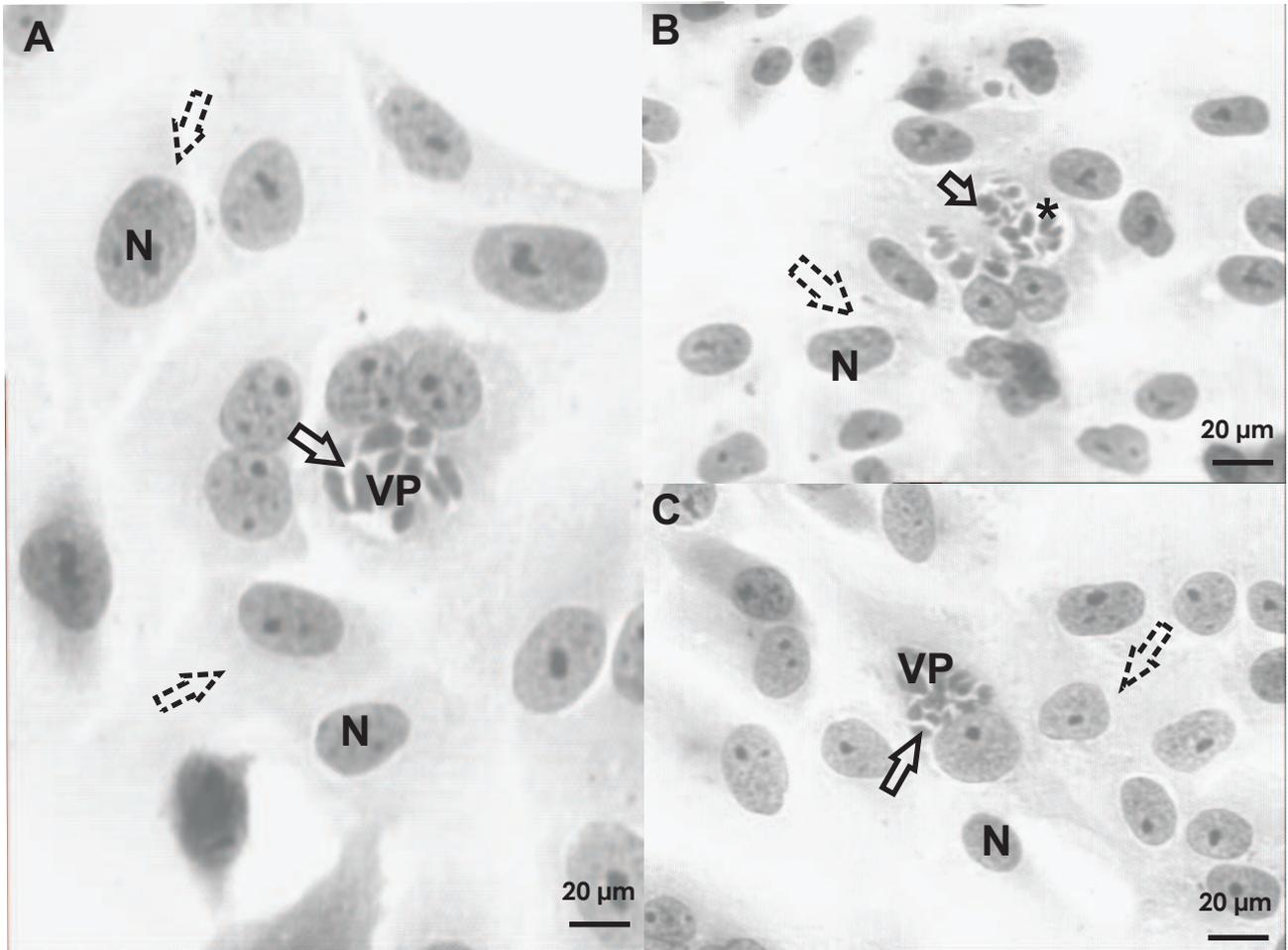
A potencialidade dos compostos pode está relacionada com a estrutura química de cada composto. De acordo com a modificação na estrutura química dos compostos, inserção de diferentes radicais, bem como, mudanças na posição do radical NO<sub>2</sub>, o mecanismo de ação de cada composto poderá ser influenciado.

Em relação aos aspectos morfológicos, demonstrados pela microscopia óptica, as mudanças nos compostos não afetaram nos respectivos resultados, que foram em sua maioria muito semelhantes entre si. Não obstante, na análise ultraestrutural, pode ser observado uma pequena diferença no parasita intracelular, que pode está relacionada às mudanças dos radicais nas estruturas químicas dos compostos. As diferenças foram mais marcantes na célula hospedeira que apresentou alterações, como algumas vacuolizações no citoplasma e alterações na disposição das organelas. Contrapondo-se ao estudo morfológico, que aparentemente não apresentou alterações na célula hospedeira.

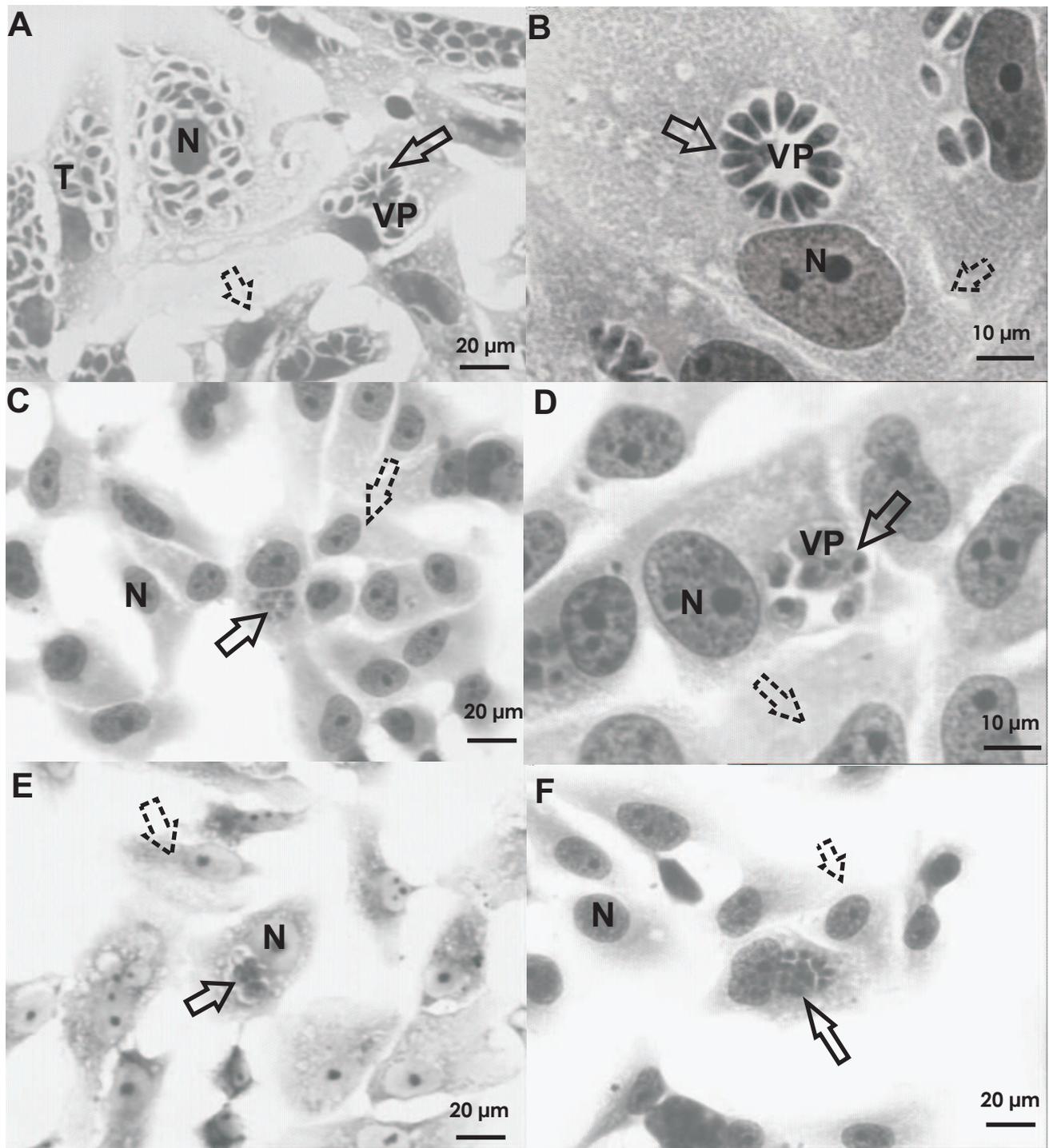
*Pranchas*



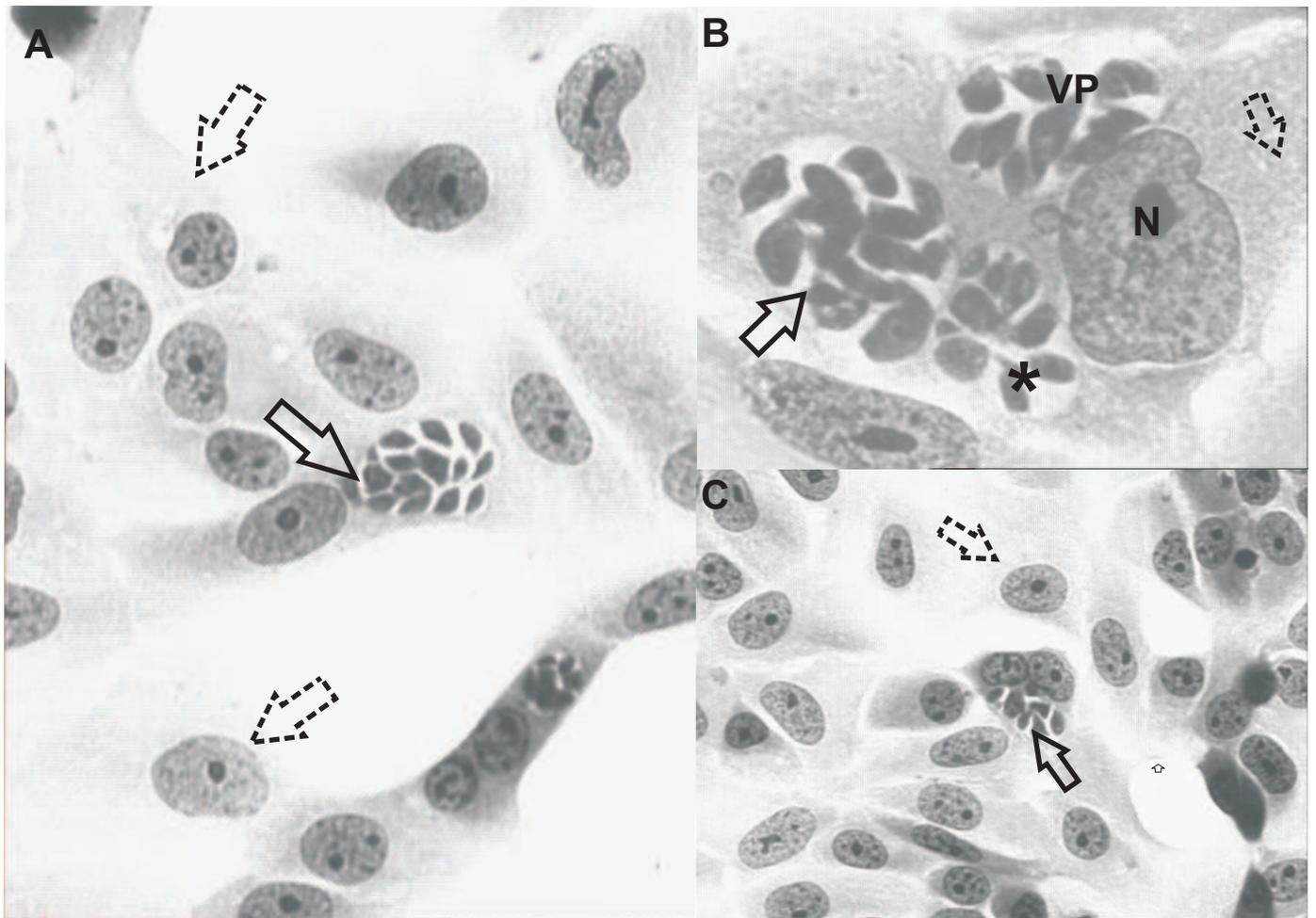
**Figura 1-** Microscopia óptica de células Vero infectadas por 24h com taquizoítos de *T. gondii* (1A,B) e tratadas por 24h com os derivados Tiosemicarbazonas 3c (1C), 3g (1D), 3e (1E) e 3d (1F). Taquizoítos normais com aspecto de rosácea (1A-B, seta) e célula hospedeira aderida ao substrato (1A-B, seta pontilhada). Após o tratamento, os taquizoítos apresentaram drásticas alterações morfológicas (1C,D,E,F, setas). A célula hospedeira encontra-se aparentemente inalterada (1C,D,E,F, seta pontilhada). T= taquizoíto; N= núcleo; VP= vacúolo parasitóforo.



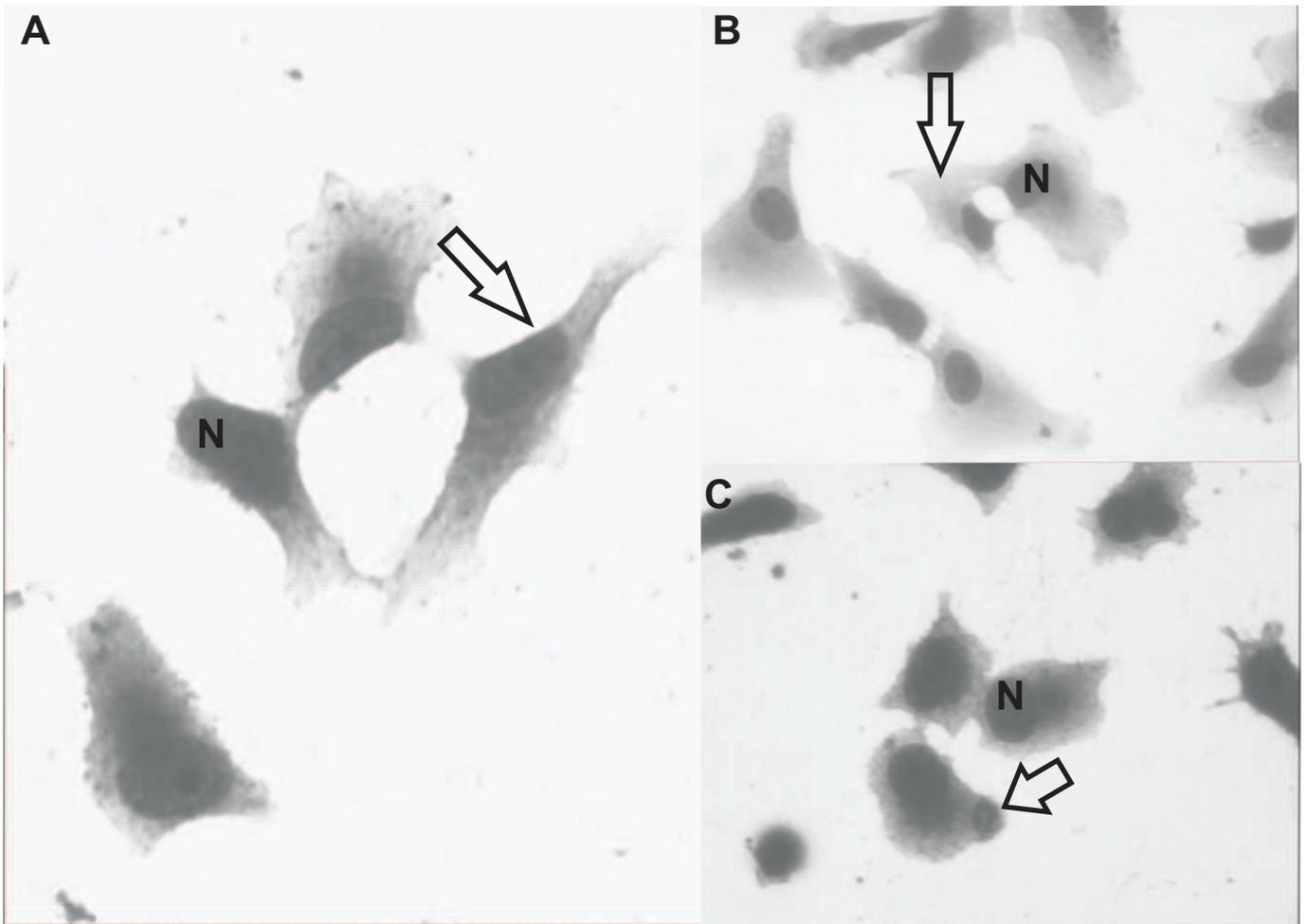
**Figura 2-** Microscopia ótica de células Vero infectadas e tratadas por 12h com os derivados Tiosemicarbonas 3d (2A); 3e (2B) e 3g (2C). Após o tratamento, taquizoítos apresentam fenótipo arredondado (2A-B-C, setas) e a célula hospedeira parece inalterada (2A-B-C, seta pontilhada). Parasitas normais também são evidenciados (2B, asterisco). P= parasita; N= núcleo; VP= vacúolo parasitóforo.



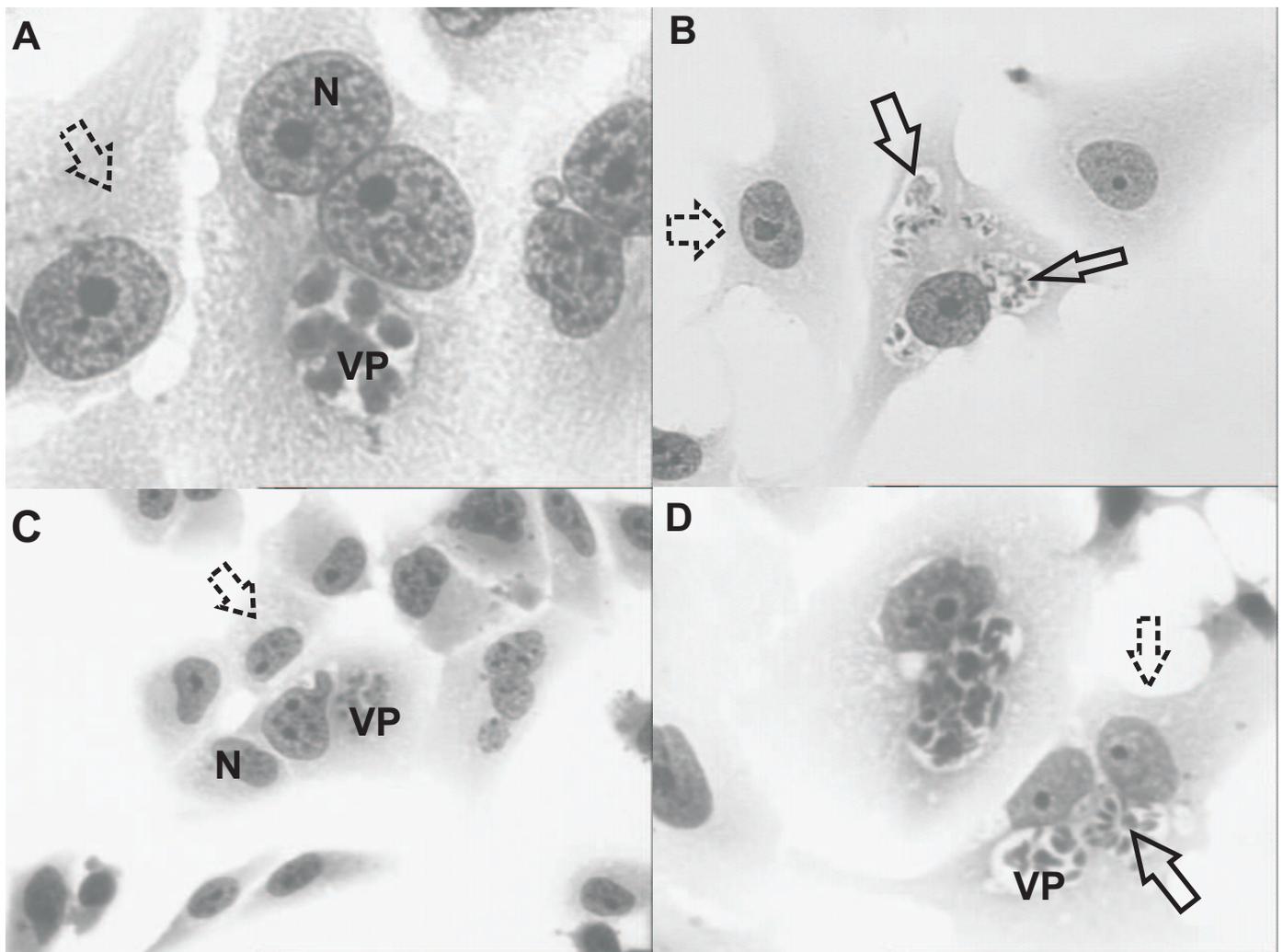
**Figura 3-** Microscopia óptica de células Vero infectadas com taquizoítos de *T. gondii*, por 24h (3A,B) e tratadas por 24h com os derivados Tiazolidinônicos 4b (3C), 4f (3D), 4e (3E) e 4j (3F). Taquizoítos normais com aspecto de rosácea (3A-B, seta) e célula hospedeira aderida ao substrato (3A, seta pontilhada). Após o tratamento alterações foram observadas nos parasitas (3C,D,E,F, setas) e a célula hospedeira aparentemente inalterada (3C,D,E,F, seta pontilhada). T= taquizoíto; N= núcleo; VP= vacúolo parasitóforo.



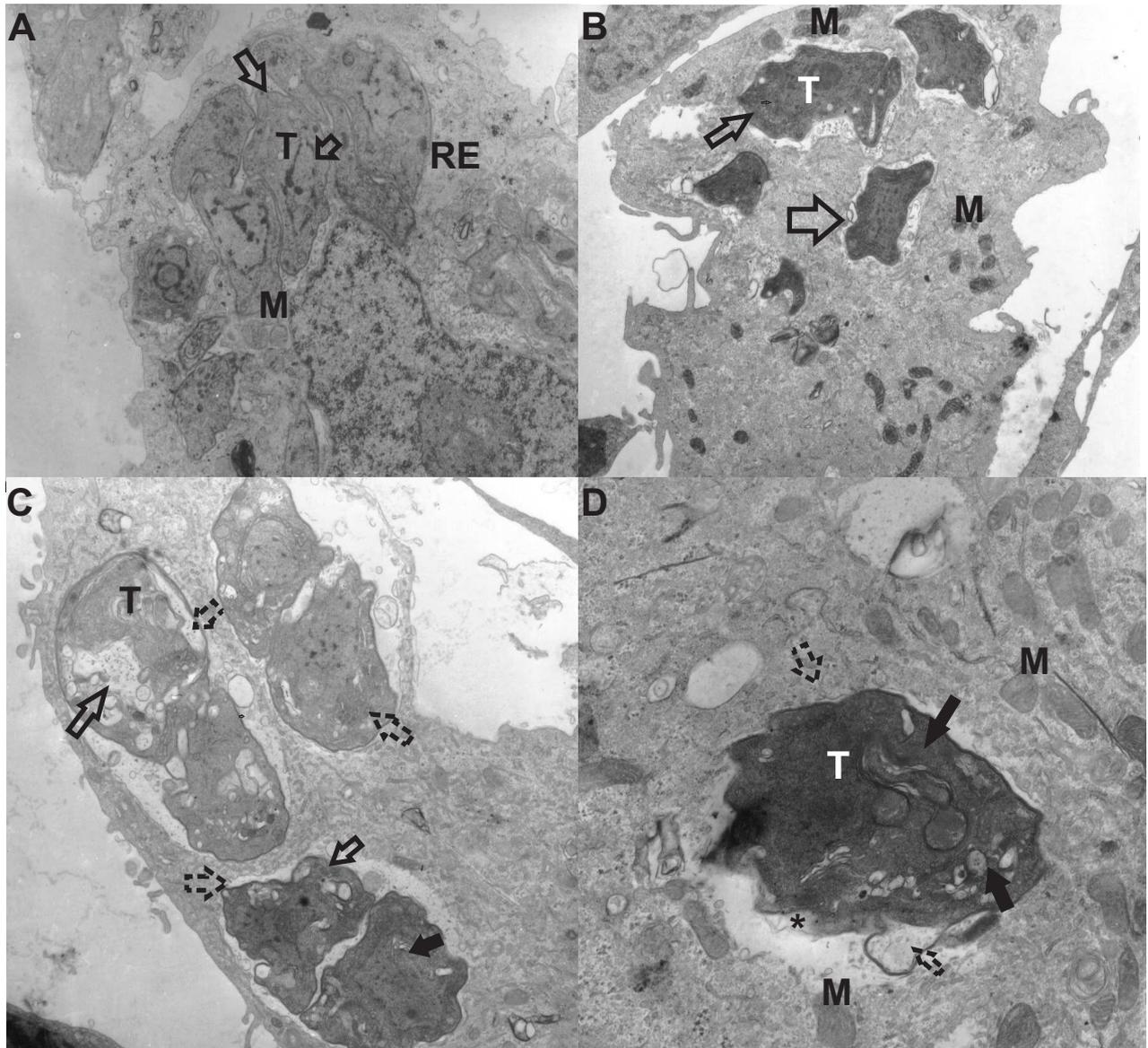
**Figura 4-** Microscopia óptica de células Vero infectadas e tratadas por 12h com os derivados Tiazolidinônicos 4b (4A); 4e (4B) e 4f (4C). Após o tratamento, parasitas com sua forma alterada foram visualizados (4A-B-C, setas). Parasitas normais também foram evidenciados (4B, asterisco). A célula hospedeira apresentou aspecto normal após o tratamento (4A-B-C, seta pontilhada). N= núcleo; VP= vacúolo parasitóforo.



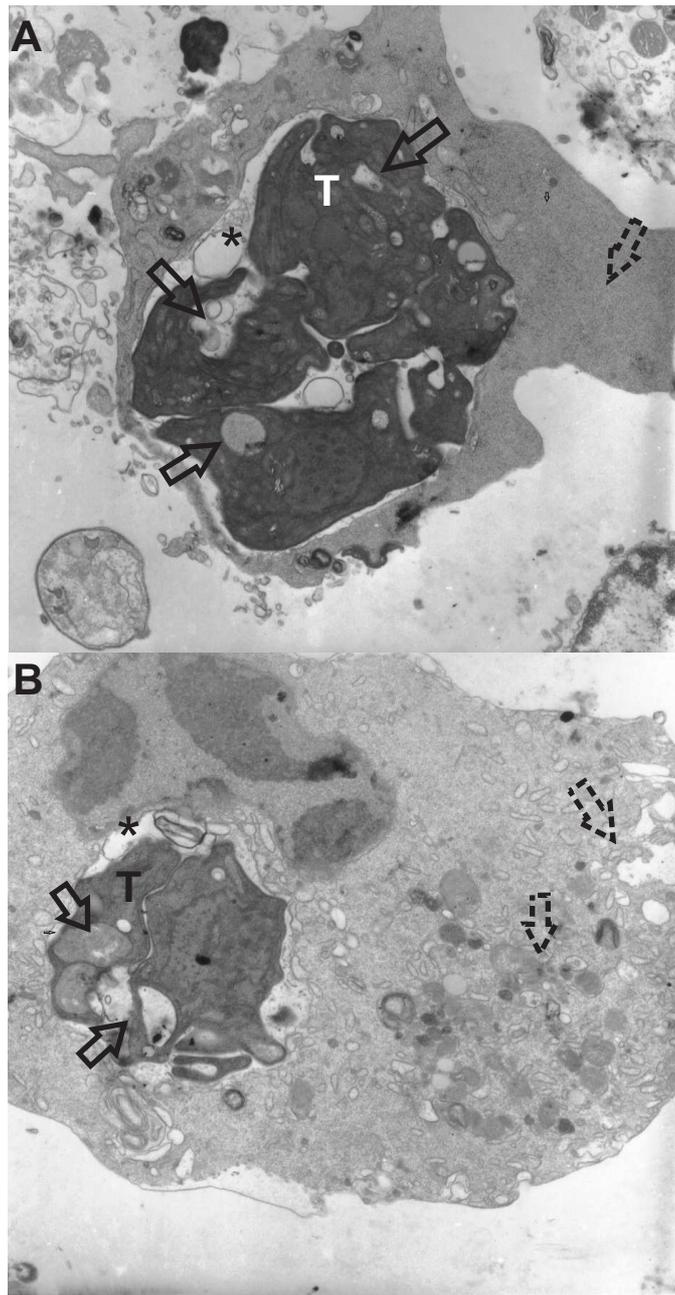
**Figura 5-** Microscopia óptica de células Vero infectadas e tratadas por 48h com os derivados Tiosemicarbazonas 3e (5A) e 3g (6B) e com Tiazolidinônico 4f (5C). Após o tratamento, as células hospedeiras sofreram drásticas alterações (5A-B-C, setas). N= núcleo



**Figura 6-** Microscopia de células Vero infectadas e tratadas por 24h com os compostos 3g (6A) e 4f (6C) e posteriormente incubadas com meio de cultura para ambos 3g (6B) e 4f (6D). Na ausência do composto 3g os parasitas não recuperaram sua capacidade infectiva, encontrando-se alterados no vacúolo (6B, setas). Na ausência do composto 4f, os parasitas foram capazes de reverter a infecção, voltando a se proliferar no vacúolo (6D, setas). A célula hospedeira encontra-se aderida ao substrato na presença ou na ausência dos compostos (6A-B-C-D, seta pontilhada). N= núcleo; VP= vacúolo parasitóforo.



**Figura 7-** Microscopia eletrônica de células Vero infectadas com taquizoítos de *T. gondii* por 24h (7A,B) e tratadas por 12h (7C) e 24h (7D) com o derivado Tiosemicarbazona 3I. Taquizoítos normais, com superfície bem marcada (7A-B, seta) e a célula hospedeira aparentemente normal, com mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático (RE) ao redor do vacúolo. Após o tratamento, os taquizoítos intravacuolares foram drasticamente alterados (7C, seta e 7D, seta cheia), porém sua superfície parece inalterado (7C-D, setas pontilhadas) e a membrana vacuolar alterada(7C-D, asterisco), nota-se também parasitas menos alterados após o tratamento por 12h (7C, seta cheia). A célula hospedeira aparentemente não foi alterada na presença desse composto, com mitocôndrias ao redor do vacúolo (M). T= taquizoíto.



**Figura 8-** Microscopia eletrônica de células Vero infectadas e tratadas por 24h com o derivado Tiazolidinônico 4I (8A-B). Parasitas totalmente alterados dentro do vacúolo, com citoplasma bem eletrondenso e vacuolizado (8A-B, setas), a membrana do vacúolo também alterada (8A-B, asterisco). A célula hospedeira apresentou citoplasma eletrondenso, vacuolizado e alteração na disposição das organelas (8A-B, setas pontilhadas). T=taquizoíto; N= núcleo.

## *Discussão*

## 5- DISCUSSÃO

Os medicamentos utilizados no tratamento da toxoplasmose não eliminam o parasita do organismo, além de causar uma série de efeitos colaterais ao hospedeiro, como depressão da medula óssea, náuseas, etc. **(Bosch-Driessen et al., 2002; Degerli et al., 2003)**. Além disso, ocorre frequentemente resistência do parasita a tais medicamentos.

Ademais, as drogas tradicionalmente usadas no tratamento da toxoplasmose são antimetabólitos que interferem na síntese ou no modo de ação do folato **(Bosch-Driessen et al., 2002)**. Os folatos são componentes essenciais para a síntese de DNA e proliferação celular. Os antimetabólitos que atuam na síntese do folato são as sulfonamidas e pirimetaminas. As sulfonamidas são administradas em conjunto com as pirimetaminas no tratamento da toxoplasmose **(Sköld, 2000)**. O uso da azitromicina sozinha ou acompanhada com as pirimetaminas também foi estabelecido contra a doença **(Bosch-Driessen et al., 2002; Degerli et al., 2003)**.

No entanto, estudos recentes mostram que o uso combinado de Sulfadiazina e Pirimetamina com azesteróis, possui uma potente atividade anti-proliferativa contra o *T. gondii*, **(Dantas-Leite et al., 2005)**, além também, de seu efeito anti-proliferativo contra parasitas tripanossomatídeos **(Urbina et al., 1996; Urbina et al., 1997; Rodrigues et al., 2002)**.

Estudos da interação parasita-célula hospedeira têm se mostrado um ótimo modelo para testes de compostos potenciais com finalidade quimioterápica. Outro alvo muito utilizado no desenvolvimento de quimioterápicos é a inibição do ciclo celular, com compostos que atuem em fase específica ou não do ciclo.

Estudos com compostos que interrompem o desenvolvimento intracelular do *Toxoplasma gondii*, acarretando em sua destruição também têm sido evidenciados **(Melo & Beiral, 2003; Melo et al., 2002; De Souza & Melo, 2000; Passos & Melo, 1999; Dantas-Leite et al., 2005)**.

Nesse trabalho, ampliando nossas investigações, analisamos a ação de novos isolados recém sintetizados de Tiosemicarbonas e seus derivados Tiazolidinônicos, em células hospedeiras infectadas com *T. gondii*, para

verificar suas respectivas ações no desenvolvimento intracelular do parasita. Esses compostos como descrito anteriormente, atuam no ciclo celular por meio da inibição da atividade enzimática da RNR (**Finch, et al., 1999; Moore et al., 1970**), comportando-se como quelantes de metais (**Bharti et al., 2003; Kasuga et al., 2003**) e pouco se sabe da sua atividade sobre o desenvolvimento do *T. gondii* intracelular.

De acordo com Hutchinson, 1985, modificações nas moléculas de Tiosemicarbazonas levam a perda substancial da atividade quimioterápica desses compostos (**Hutchinson, 1985**). No entanto, as mudanças na estrutura química dos compostos utilizados no presente trabalho, não interferiram, de modo geral, no mecanismo de ação dos compostos. Os compostos apresentaram em sua maioria resultados semelhantes, relacionados à análise morfológica. Porém, mudanças foram observadas na análise ultraestrutural, e estas podem está diretamente relacionadas aos diferentes fenótipos apresentados pelos parasitas, principalmente das células hospedeiras, durante os tratamentos com os compostos.

### **5.1- Célula hospedeira/*Toxoplasma gondii***

Parasitas intracelulares obrigatórios, como, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania Trypanosoma cruzi*, para estabelecer uma infecção na célula hospedeira evadem de seus diferentes mecanismos microbicidas impostos pela célula hospedeira (**Corsaro et al., 1999**).

O *T. gondii*, durante o seu processo de infecção, impede a produção de radicais reativos produzidos pela célula hospedeira e também a acidificação e fusão do vacúolo parasitóforo com organelas da via endocítica. Então, dessa forma, o parasita desenvolve estratégias de sobrevivência, procurando vencer e burlar os mecanismos de defesa impostos pela célula hospedeira.

A inibição desses mecanismos está relacionada principalmente com o ambiente intracelular que abriga o parasita, o VP. Além disso, esse ambiente dificulta a ação de drogas contra o parasita. Porém, no presente trabalho, o VP foi o nosso principal alvo, uma vez que utilizamos compostos que atuam sobre o desenvolvimento intracelular do *T. gondii*.

A análise do aspecto morfológico, através da microscopia ótica, demonstrou que os derivados Tiosemicarbonas, bem como os derivados Tiazolidinônicos, interromperam o desenvolvimento intracelular do *Toxoplasma gondii*, alterando sua morfologia, levando a uma drástica redução do seu número e de células hospedeiras infectadas, no tempo de 24h de incubação.

O tempo de incubação de 24h foi proposto, pelo fato de não ter ocorrido ainda a lise celular das células hospedeiras infectadas pelos parasitas, além disso, nesse tempo de incubação, a maioria das células presentes na cultura encontra-se infectadas, tornando-se mais abrangentes os resultados dos compostos testados.

A concentração que foi utilizada para cada composto foi aquela que na sua presença, pudemos verificar um melhor impacto na cultura de modo geral: com as células aparentemente inalteradas e os parasitas drasticamente alterados ou mesmo destruídos no interior do VP.

Diante da análise do número de vacúolos, torna-se claro que, apesar do VP ser um alvo difícil para a ação de compostos em geral, no presente trabalho, foi possível constatar o efeito de todos os compostos nesse alvo intracelular, visto que a multiplicação dos parasitas intracelulares foi inibida juntamente com a sua provável destruição ou mesmo eliminação da cultura após o tratamento com os respectivos compostos.

Como mencionado anteriormente, para estabelecer uma infecção na célula hospedeira, o *T. gondii* burla o seu sistema de defesa, utilizando-se de várias estratégias de sobrevivência no interior do VP. Neste trabalho, foi possível verificar que o tratamento com as Tiosemicarbonas e seus derivados Tiazolidinônicos, levou a eliminação dos parasitas no interior do VP.

O processo de eliminação do *T. gondii* intracelular, pode estar relacionado com a reativação do mecanismo de defesa da célula hospedeira. **Carvalho & Melo, 2002 e Carvalho & Melo, 2006**, demonstram que após o tratamento com a Hidróxiuréia, que também é uma Tiosemicarbona, ocorre ativação da via endocítica da célula hospedeira, com a fusão do VP com os lisossomos e a conseqüente eliminação do parasita no interior do VP, além de causar também, perturbações nas organelas secretoras. Então sugere-se que o mesmo pode ter acontecido no tratamento com as Tiosemicarbonas e seus derivados Tiazolidinônicos no presente trabalho.

A infecção do *T. gondii* na cultura é assincrônica, ou seja, os parasitas apresentam-se em diferentes fases de seu ciclo. Diante desse fato, pudemos observar nesse trabalho, fenótipos diferenciados dos parasitas: alguns se encontravam em processo de destruição, outros totalmente destruídos ou ainda uma minoria com aspecto normal. Todavia, no interior do VP o desenvolvimento do parasita se dá de forma sincrônica, por isso, encontramos VP com parasitas totalmente destruídos, outros com parasitas em processo de destruição e ainda VP com parasitas normais, embora a presença desses últimos tenha sido menos freqüente.

Alguns estudos têm demonstrado que a utilização de Hidroxiuréia (HU) a uma concentração de 5 mM, sincroniza culturas celulares, sem produzir alterações morfológicas ou ultraestruturais em células hospedeiras tratadas **(Galanti et al 1994; Hofer et al 1998; Taylor et al 1999)**.

Tal como a Hidroxiuréia, os efeitos das Tiosemicarbonas assim como de seus derivados Tiazolidinônicos sobre a proliferação celular são mais pronunciados sobre a fase S do ciclo celular **(Finch et al., 1999)**, devido sua ligação à enzima ribonucleotídeo redutase e sua conseqüente inativação. No entanto, por se ligarem com uma maior afinidade à enzima, as Tiosemicarbonas e seus derivados Tiazolidinônicos, possuem resultados mais significativos, quando comparados com a Hidroxiuréia, uma vez que esta possui uma baixa afinidade pela enzima **(Krakoff, 1975)**, além de uma meia-vida curta **(Beckloff et al., 1965)**, apesar de ter uma grande aplicabilidade clínica. Uma das limitações de HU é o desenvolvimento de resistência, a qual pode ocorrer por diferentes mecanismos envolvendo mudanças quantitativas e qualitativas na enzima. HU é muito utilizada no tratamento de câncer de mama, de colo do útero e outros **(Gwilt & Tracewell, 1998)**.

Ademais, durante a incubação com os novos isolados de Tiosemicarbonas e seus derivados Tiazolidinônicos, aqueles parasitas no interior do VP, que não se encontravam na fase S do ciclo celular, não foram afetados e mantiveram-se morfolologicamente normais. Esses parasitas, na ausência dos compostos, voltaram a se multiplicar re-estabelecendo a infecção. No entanto, os parasitas que se encontravam realizando o seu ciclo celular durante a incubação com os compostos foram drasticamente afetados e não conseguiram recuperar sua capacidade infectiva/proliferativa na ausência

dos derivados. Isso demonstra que as Tiosemicarbazonas e seus derivados Tiazolidinônicos são agentes específicos de fase, pois só foi possível verificar a ação desses compostos naqueles parasitas que se encontravam na fase S do seu ciclo celular.

Estudos evidenciam ainda que, no tratamento com a Hidroxiuréia, a infecção pelos parasitas foi praticamente eliminada da cultura somente após 48h de incubação, embora o processo inicial de destruição do parasita tenha sido constatado bem antes desse tempo (**Melo & Beiral, 2003**). Por outro lado, na presença dos novos derivados de Tiosemicarbazonas e derivados Tiazolidinônicos o efeito mais drástico foi constatado, no tempo de 24h de incubação, onde a cultura encontrava-se quase desprovida de parasitas e também de células infectadas (**Tenório et al., 2005**). No entanto, na presença desses derivados por 48h, drásticas alterações na célula hospedeira foram observadas. Esses resultados se devem provavelmente a diferente afinidade com que os compostos se ligam à enzima RNR.

Além disso, estudos utilizando a forma hormonal da vitamina D (1,25-Dihidroxitamina D3), que possui também atividade anti-proliferativa, entre outras, revelam que, sua aplicabilidade induz apoptose e aumenta a susceptibilidade à toxoplasmose em tratamento “in vivo” (**Rajapakse et al., 2005**). No entanto, nossos estudos com os novos isolados de Tiosemicarbazonas, não foram ainda avaliados sob esse ponto de vista.

Em adição, a utilização de compostos, como “jasplakinolide”, “Calphostin”, “Genistein” e “Wortmanin” que afetam respectivamente os filamentos de actina, fosfolipase C, tirosinoquinases e fosfatidilinositol-3-quinase, no processo de interação de taquizoítos de *T. gondii* com célula polimorfonuclear, promoveu redução na proporção da infecção da célula hospedeira pelo parasita, através de uma significativa inibição da internalização do parasita (**MacLarem & De Souza, 2004**). Porém, nossos estudos evidenciam somente o padrão de desenvolvimento intracelular do *T. gondii* na presença dos novos derivados e não de seu comportamento invasivo.

Diante dos resultados apresentados, constatamos que a presença dos compostos recém sintetizados de Tiosemicarbazonas e seus derivados Tiazolidinônicos alteraram drasticamente a morfologia, ultraestrutura e

multiplicação dos taquizoítos de *T. gondii*, promovendo sua destruição e eliminação da célula hospedeira na cultura. Tal efeito proporcionou também, uma acentuada redução no número de parasitas normais e nas células infectadas, estas por sua vez, quando presentes possuíam a maioria dos seus vacúolos com parasitas destruídos, estes por sua vez, não recuperaram sua capacidade de desenvolvimento e multiplicação, devido provavelmente a inativação da enzima RR pela alta afinidade de ligação desses compostos.

## *Conclusões*

## 6- CONCLUSÕES

- A análise da ação biológica dos compostos (citotoxicidade) revelou o coeficiente de inibição ( $IC_{50}$ ) dos compostos e a concentração padrão de 1,5 mM para todos os compostos analisados.

- Dados quantitativos revelaram que na presença de todos os compostos das duas séries houve decréscimo do número de células infectadas e do número de parasitas após o tratamento em todos os tempos de incubação, porém essa diminuição foi bem maior no tempo de 24h. O número de vacúolos com parasitas alterados ou em processo de destruição foi maior no tratamento de 12h, devido ao maior número de células infectadas.

- Após o tratamento, com os compostos de ambas as séries em todos os tempos de incubação, houve alterações na morfologia e ultraestrutura dos taquizoítos intracelulares, sendo tais alterações, mais drásticas no tempo de 24h de tratamento. Os parasitas perderam o aspecto normal de meia-lua e passaram a apresentar formato arredondado e semelhante a inclusões citoplasmáticas.

- O tratamento por 48h, causou drásticas alterações nas células hospedeiras e praticamente eliminação dos parasitas da cultura. No entanto, nos outros tempos de incubação a célula hospedeira pareceu inalterada morfolologicamente.

- A análise da reversibilidade revelou que na ausência do derivado de Tiosemicarbazona, não houve estabelecimento da infecção pelos parasitas que foram tratados por 24h. Porém, na ausência do derivado Tiazolidinônico, os parasitas (também tratados por 24h) foram capazes de estabelecer nova infecção.

- A análise ultraestrutural confirmou as alterações nos parasitas apresentadas pela análise morfológica. Além disso, na presença do derivado Tiazolidinônico, foi possível observar alterações também na célula hospedeira, como vacuolizações citoplasmáticas e alterações na distribuição das organelas celulares.

## *Referências*

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achbarou, A.; Mercereau-Puijalon, O.; Autheman, J.M.; Fortier, B.; Camus, D. & Dubremetz, J.F. (1991). Characterization of microneme proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47:223-234.
- Adjogble, D.Z.K.; Mercier, C.; Dubremetz, J.F.; Hucke, C.; MacKenzie, C.R.; Cesbron-Delauw, M.F. & Däubener, W. (2004). GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *I. J. Parasitol.* 34:1255-1264.
- Akinchan, N.T.; Drozdowski, P.M. & Holzer, W. (2002). Synthesis and spectroscopic studies on zinc(II) and mercury(II) complexes of isatin-3-thiosemicarbazone. *Journal of Mol. Struct.* 641:17-22.
- Alves, A.J.; Leite, A.C.L.; Santana, D.P.; Beltrão, T.M. & Coelho. M.R.D. (1993). Synthesis of some 4-oxo- $\Delta^2$ -thiazolin-2-ylhydrzones as potential antiprotozoal agents. *IL. Farmaco.* 48(8):1167-1171.
- Beckers, C.J.M., Dubremetz, J.F., Mecerau-Puijalon, O. & Joiner, K.E. (1994). The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite and is exposed to the host cell cytoplasm. *J. Cell Biol.* 127:947-961.
- Beckers, C.J.M.; Wakefield, T. & Joiner, K.A. (1997). The expression of *Toxoplasma* proteins in *Neospora caninum* and the identification of a gene encoding a novel rhoptry protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89: 209-223.
- Beckloff, G.L.; Lerner, H.J.; Frost, D; Russo-Alesi, F.M. & Gitomer, S. (1965). Hydroxyurea (NSC-32065) in biologic fluids: Dose-concentration relationship. *Cancer Chemother. Rep.* 48:57-58.

- Bezanilla, M., Wilson, J.M. & Pollard, T.D. (2000). Fission yeast myosin-II isoforms assemble into contractile rings at distinct times during mitosis. *Curr. Biol.* 10:397-400.
- Bharti, N.; Husain, K.; Garza, M.T.G.; Cruz-Vega, D.E.; Castro-Garza, J.; Mata-Cardenas, B.D. & Naqvi, F.; Azam, A. (2002). Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Letter.* 12:3475-3478.
- Bharti, N.; Shailendra.; Sharma, S.; Naqvi, F. & Azam, A. (2003). New palladium (II) complexes of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones: synthesis, spectral studies and in vitro anti-amoebic activity. *Bioorg. Med. Chem.* 11:2923-2929.
- Bi, G.Q.; Morris, R.L.; Liao, G.; Alderton, J.M.; Scholey, J.M. & Steinhardt, R.A. (1997). Kinesin- and myosin-driven steps of vesicle recruitment for Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis. *J. Cell. Biol.* 138:999-1008.
- Black, M.W & Boothroyd, J.C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:607-623.
- Blackman, M. (2000) Proteases involved in erythrocyte invasion by the malaria parasite: Function and potential as chemotherapeutic targets. *Curr Drug Targets.* 1: 59-83.
- Bonhomme, A.; Pingret, L. & Pinon, J.M. (1992). Review: *Toxoplasma gondii* cellular invasion. *Parasitol.* 54:31-43.
- Bonhomme, A.; Bouchot, A.; Pezzella, N.; Gomez, J.; Le Moal, H. & Pinom, J.M. (1999). Signaling during the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Microb. Rev.* 23:551-561.

- Bosch-Driessen, L.H.; Verbraak, F.D.; Suttorp, M.S.; van Ruyven, R.L.; Klok, A.M.; Hoyng, C.B. & Rothova, A. (2002). A prospective, randomized trial of pyrimethamine and azithromycin vs pyrimethamine and sulfadiazine for treatment of ocular toxoplasmosis. *Am. J. Ophthalmol.* 134:34-40.
- Brossier, F.; Jewett, T.J.; Lovett, J.L. & Sibley, L.D. (2003) C-terminal processing of the *Toxoplasma* protein MIC2 is essential for invasion into host cells. *J. Biol. Chem.* 278:6229-6234.
- Brown, F.C. (1961). 4-Thiazolidinones. *Chem. Revs.* 61:463-521.
- Carruthers, V.B. & Sibley, L.D. (1997) Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell. Biol.* 73: 114-123.
- Carruthers, V.B. & Sibley, L.D. (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 31: 421-428.
- Carruthers, V.B.; Giddings, O.K. & Sibley, L.D. (1999). Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cell. Microbiol.* 1: 225-235.
- Carvalho, C.S. & Melo, E.J.T. (2002). Fusion lysosomes-parasitophorous vacuole containing *Toxoplasma gondii* in host cells treated with hidroxyurea. *Rev. Inst. Medicina Tropical de São Paulo*, 44 (supl.12). *XVI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology.*
- Carvalho, C.S. & Melo, E.J.T. (2006). Acidification of the parasitophorous vacuole containing *Toxoplasma gondii* in the presence of hidroxyurea. *Annals of the Brazilian Academy of Science.* 78:1-10.

- Casas, J.S.; Garcia-Tasende, M.S. & Sordo, J. (2000). Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. *Coord. Chem. Rev.* 209:197-261.
- Casero, R.A.; Kalyman, D.L.; Childs, G.E.; Scovill, J.P. & Desjardins, R.E. (1980). Activity of 2 acetylpyrimidine thiosemicarbazones against *Trypanosoma rhondeniense* in vitro. *Antimicrob. Agents. Chem.* 18 (2):317-322.
- Charif, H.; Darcy, F.; Torpier, G.; Cesbron-Delauw, M.F. & Capron, A. (1990). *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* 71:114-124.
- Chaturvedi, S.; Qi, H.; Coleman, D.; rodriguez, A.; Hanson, P.I.; Striepen, B.; Roos, D.S. & Joiner, K.A. (1999). Constitutive calcium-independent release of *Toxoplasma gondii* dense granules occurs through the NSF/SNAP/SNARE/Rab machinery. *J. Biol. Chem.* 274: 2424-2431.
- Cintra, W.M. & De Souza, W. (1985). Immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins and electron microscopy of detergent extracted tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Submicrosc. Cytol.* 17:503–508.
- Conseil, V.; Soete, M. & Dubremetz, J.F. (1999). Serine protease inhibitors block invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Int. Jour. Antimicrob. Agen. Chem.* 43: 1358-1361.
- Coppens, I & Joiner, K.A. (2003). Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* cell entry by modulating organelle discharge. *Mol. Biol. Cell.* 14:3804-3820.

- Corsaro, D.; Venditti, D.; Padula, M. & Valassina, M. (1999). Intracellular Life. *Critical Reviews in Microbiology*. 25(1):39-79.
- Cory, J.G. & Sato, A. (1983). Regulation of ribonucleotide reductase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biochem*. 53:257-266.
- Dantas-Leite, L.; Urbina, J.A.; De Souza, W. & Vommmaro, R.C. (2005). Antiproliferative synergism of azesterols and antifolatos against *Toxoplasma gondii*. *Int. Jour. Antimicrob. Agents Chemother*.
- De Souza, W. & Souto-Padron, T. (1978). Ultrastructural localization of basic proteins on the conoid, rhoptries and micronemes of *Toxoplasma gondii*. *Z. Parasitenkd*. 56: 123- 129.
- De Souza, W. (1994). Estratégias parasitárias de los protozoários intracelulares. *Invest. Cienc*. 212:56-63.
- De Souza, W.; de Carvalho, T.U.; de Melo, E.T.; Soares, C.P.; Coimbra E.S.; Rosestolato, C.T.; Ferreira, S.R. & Vieira, M. (1998) The use of confocal laser scanning microscopy to analyse the process of parasitic protozoon-host cell interaction. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 31:1459-1470.
- De Souza, W. & Melo, E.J.T. (2000). Effects of hydroxyurea on intracellular *Toxoplasma gondii*. *Fems Microbiological Letters*, v. 185, n. 1, p. 79-85.
- Degerli, K., Kilimcioglu, A.A., Kurt, O., Tamai, A.T. & Ozbilgin, A. (2003). Efficacy of azithromycin in a murine toxoplasmosis model, employing a *Toxoplasma gondii* strain from turkey. *Acta Tropica*. 88:45-50.
- Disponível em: site [www.arches.uga.edu/~gubbels/LyticCycle](http://www.arches.uga.edu/~gubbels/LyticCycle).

- Dobrowolski, J.M. & Sibley L.D. (1996). *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*. 84: 933-939.
- Dobrowolski, J. & Sibley, L.D. (1997). The role of the cytoskeleton in host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Behring. Inst. Mitt.* 99:90–96.
- Dobrowolski, J.M.; Carruthers, V.B. & Sibley, L.D. (1997). Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 26:163-173.
- Dobrowolski, J.M.; Niesman, L. R. & Sibley, L.D. (1997). Actin in *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACTJ and exists primarily in globular form. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 37:253-262.
- Donehower, R.C. (1996). Hydroxyurea. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy.* 253-260.
- Dood, R.H.; Ouanes, C.; Robert-Gero, M. & Potier, P. (1989). Hybrid molecules: Growth inhibition of *Leishmania dovani* promastigotes by thiosemicarbazones of 3-carboxyil- $\beta$ -carboline. *J Med Chem* 32:1272-1276.
- Dubey, J.P.; Miller, N.L. & Frenkel, J.K. (1970). The *Toxoplasma gondii* oocysts from cat feces. *J. Exp. Med.* 132: 636-662.
- 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.
- Dubremetz, J.F. & Schwarzman, J.D. (1993) Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion. *Res. Immunol.* 144:31–33.

- Dubremetz, J.F.; Achbarou, A.; Bermudes, D. & Joiner, K.A. (1993). Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii* host cell interaction. *Parasitol. Res.*,79:402-408.
- Dubremetz, J.F.; Garcia-Réguet, N.; Conseil, V. & Fourmaux, M.N. (1998). Apical organelles and host cell invasion by Apicomplexa. *Int. J. Parasitol.* 28: 1007-1013.
- Easmon, J.; Heinisch, G.; Holzer, W. & Rosenwirth, B. (1992). Novel thiosemicarbazones derived from formyl and acyldiazines: synthesis, effects on cell proliferation and synergism with antiviral agents. *J. Med. Chem.* 35:3288-3296.
- Elford, H.L.; Freese, M.; Passamani, E. & Morris, H.P. (1970). Ribonucleotide reductase and cell proliferation 1. Variations of ribonucleotide reductase activity with tumor grown in a series of rats hepatomas. *J. Biol. Chem.* 245:5228-5233.
- Endo, T.; Sethi, K.K. & Piekarski, G. (1982). *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187-mediated exist of trophozoites from infected murine macrophages. *Exp. Parasitol.* 53:179-188.
- Endo, T. & Yagita, K. (1990). Effect of extracellular ions on motility and cell entry in *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* 37:133-138.
- Endo, T., Yagita, K. & Nakamura, T. (1998). Detection a localization of actin in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 75:102-106.
- Entzeroth, R.; Kerckhoff, H. & Koning, A. (1992). Microneme secretion in Coccidia: confocal laser scanning and electron microscope study on microneme secretion of *Sacrocystis muris* using a monoclonal antibody. *Eur. J. Cell. Biol.* 59: 405-413.

- Field, C., Li, R. & Oegema, K. (1999). Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11:68–80.
- Finch, A.R.; Liu, M.; Cory, A.H.; Cory, J.G. & Satorelle, A.C. (1999). Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde; 3-AP): an inhibitor of ribonucleotide reductase with antineoplastic activity. *Advan. Enzyme Regul.* 39:3-12.
- Fourmaux, M.N.; Achbarou, A.; Mercereau-Puijalon, O.; Biderre, C.; Briche, I.; Loyens, A.; [Odberg-Ferraqut C.](#); [Camus D.](#) & [Dubremetz J.F.](#) (1996). The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83:201-210.
- Foussard, F.; Leriche, M.A. & Dubremetz, J.F. (1991). Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. *Parasitology.* 102:367-370.
- Frenkel, J.K.; Dubey, J.P. & Miller, N.L. (1969). *Toxoplasma gondii*: oocysts, sporozoites and infection of cultured cells. *Science.* 167: 892-896.
- Frenkel, J.K.; Dubey, J.P. & Miller, N.L. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as Coccidian oocysts. *Science.* 167: 893-896.
- Frenkel, J.K. (1990). Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. *J. Am. M. Acad. (JAMA).* 196: 233- 240.
- Frixione, E.; Mondragon, R.; Meza, I. (1996). Kinematic analysis of *Toxoplasma gondii* motility. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 34:152–163.
- Furtado, G.C.; Slowik, M.; Kleinman, H.K. & Joiner, K.A. (1992a). Laminin enhances binding of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to J774 murine macrophage cells. *Infect. Immun.* 60: 2337-2342.
- Furtado, G.C.; Cao, Y. & Joiner, K.A. (1992b). 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.* 1992; 60: 4925-4931.
- Galanti N., Dvorak, J.A., Grenet, J. & McDaniel, J.P. (1994). Hydroxyurea-induced synchrony of DNA replication in the Kinetoplastida. *Experimental Cell. Research.* 214: 225-230.
- Garcia-Réguet, N.; Lebrun, M.; Fourmaux, M.N.; Mercereau-Puijalon, O.; Mann, T.; Beckers, C.J.M.; Samyn, B.; Van Beeumen, J.; Bout, D. & Dubremetz, J.F. (2000). The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cell. Microbiol.* 2: 353-364.
- Gavin, M.A.; Wanko, T. & Jacobs, L. (1962). Electron microscope studies of reproducing and interkinetic *Toxoplasma*. *J. Protozool.* 99:222-234.
- Goldenberg, R.L. & Thompson, C. (2003). The infections origins of stillbirth. *Am J. Obstet. Gynecol.* 189:861-73.
- Goode, B.L.; Drubin, D.G. & Barnes, G. (2000). Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 12:63–71.
- Grimwood, J. & Smith, J.E. (1992) *Toxoplasma gondii*- the role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion. *Exp. Parasitol* 74:106-111.
- Guimarães, F.N. & Meyer, H. (1942). Cultivo de *Toxoplasma Nicole* e *Maceaux*, em culturas de tecidos. *Re. Brasi.l Biol.* 2:123-129.
- Gürsoy, A.; Terzioglu, N. & Ötük, G. (1997). Synthesis of some new hydrazide-hydrazones, thiosemicarbazides and thiazolidinones as possible antimicrobiais. *Eur. J. Med. Chem.* 32:753-757.

- Gwilt, P.R. & Tracewell, W.G. (1988). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydroxyurea. *Clin. Pharmacokinet.* 34: 347-358.
- Hakansson, S.; Charron, A.J. & Sibley, L.D. (2001). *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO. J.* 20:3132-3144.
- Halonen, S.K. & Weidner, E. (1994). Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuole with host cell vimentin type intermediate filaments. *J. Euk. Microbiol.* 41:64-71.
- Hoagland, C. (1992). Hematologic complications of cancer chemotherapy. *Chem. Source book 9M.Perry Ed. Williams & Wilkins, Baltimore.* pp. 498-507.
- Hofer, A.; Ekaren, J.T. & Thelander, L. (1998). Allosteric regulation of *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase studie *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 273: 34098-34104.
- Hoff, E.F. & Carruthers, V.B. (2002). Is *Toxoplasma* egress the first step in invasion? *Trends. Parasitol.* 18:251-255.
- Hu, K., Roos, D.S. & Murray, J.M. (2002). A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Biol.* 156:1039-1050.
- Hutchinson, W.M. & Dunachie, J.F. (1971). The life cycle of the coccidian parasite *Toxoplasma gondii* in the domestic cat. *Trans. R. Sci. Med. Hyg.* 65:380-399.
- Hutchinson, D.W. (1985). Metal chelators as potential antiviral agents. *Antiviral Research*, 5:193-205.

- Joiner, K.A.; Fuhrman, S.A.; Miettinen, H.M; Kasper, L.H. & Mellman, I. (1990). *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuole in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science*. 249:641-646.
- Joiner KA. & Dubremetz J.F. (1993). *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. *Infect. Immun.* 61:1169–1172.
- Jones, T.C. & Hirsch, J.G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *J. Exp. Med.* 136:1173-1194.
- Kasper, L.H. & Boothroyd, J.C. (1993). Molecular Biology of Parasite Infections. Ed. Warren, K. S. (Blackwell, Boston) 260-301.
- Kasper, L.H. & Mineo, J.R. (1994). Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today*. 10:184-188.
- Kasuga, N.C.; Sekino, K.; Ishikawa, M.; Honda, A.; Yokoyama, M.; Nakano, S.; Shimada, N. & Nomiya, K. (2003). Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 12 zinc (II) complexes with thiosemicarbazone and two semicarbazone ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry* 96:298-310.
- Kepca, O. & Scholtyseck, E. (1970). Weitere untersuchungen der feinstruktur von *Frenkelia* species (M-Organismus, Sporozoa). *Protisologic* 6:249-366.

- Khawass, S.M.E.; Khalil, M.A. & Chaaban, I. (1989). Synthesis of some thiazoline and thiazolidinone derivatives of 1,4-benzoquinone as potential antimicrobial agents. *IL. Farmaco.* 44(4):415-421.B
- Kieschnick, H.; Wafefield, T.; Narducci, C.A. & Beckers, C. (2001). *Toxoplasma gondii* attachment to the host cells is regulated by a calmodulin-like domain protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276:12369-12377.
- Kim, K. (2004). Role of protease in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa. *Acta Tropica.* 91:69-81.
- Köhler, S.; Delwiche, C.F.; Denny, P.W.; Tilney, L.G.; Webster, P.; Wilson, R.J.M.; Palmer, J.D. & Roos, D.S. (1997). A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science.* 275: 1485-1489.
- Krakoff, I.H. (1975). Clinical and pharmacologic effects of hydroxyurea. *Antineoplastic and Immunosuppressive Agents. pp 789-792. Part 2* (Sartorelli, A.C and Johns, D.G, eds.). *Springer-Verlag, New York.*
- Küçüküzgel, S.G.; Oruç, E.E.; Rollas, S.; Sahin, F. Özbek, A. (2002). Synthesis, characterization and biological activity of novel 4-thiazolidinones, 1,3,4-oxadiazoles and some related compounds. *Eur. J.Med. Chem.* 37:197-206.
- Labruyere, E.; Lingnau, M.; Mercier, C.; Sibley, L.D. (1999). Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102:311-321.
- Lecordier, L.; Mercier, C.; Sibley, L.D. & Cesbron-Delauw, M.F. (1999). Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. *Mol. Biol. Cell.*10:1276-1287.

- Leriche, M.A. & Dubremetz, J.F. (1991). Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45: 249-260.
- Levine, N.D. (1988). Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. *J. Protozool.* 35: 518-520.
- Liu, H.L.; Li, Z. & Anthonzen, T. (2000). Synthesis and fungicidal activity of 2-imino-3-(4-arylthiazol-2-yl)-thiazolidin-4-ones and their 5-arylidene derivatives. *Molecules* 5:1055-1061.
- Lovett, J.L. & Sibley, L.D. (2003). Intracellular calcium stores in *Toxoplasma gondii* govern invasion of host cells. *J. Cell. Sci.*166: 3009-3016.
- Luft, B.J. & Remington, J.S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 15:211-222.
- Luft, B.J.; Brooks, R.G.; Conley, F.K.; McCabe, R.E. & Remington, J.S. (1993). Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *New Eng. J. Med.* 329:995-1000.
- MacLaren, A.; Attias, M. & De Souza, W. (2005). Aspects of the early moments of interaction between tachyzoites of *Toxoplasma gondii* with neutrophils. *Veterinary Parasitol.* 125:301-312.
- Magno, R.C.; Lemgruber, L.; Vommaro, R.C.; De Souza, W. & Attias, M. (2005). Intravacuolar network may act mechanical *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc. Resear. and Tech.* 67:45-52.

- Manger, I.D.; Hehl, A.B & Boothroyd, J.C. (1998). The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect Immun* 66:2237–2244.
- Martin, S. (2001). Congenital Toxoplasmosis. *Neonatal Netw.*, 20:23-30.
- Mehlhorn, H.; Senaud, J.; Chabotar, B.; Scholtyseck, E. (1975). Electron microscopic studies of cyst stages of *Sarcocystis tenella*: the origin of micronemas and rhoptries. *Z. Parasit.* 45:227-236.
- Meisner, M.; Schluter, D. & Soldati, D. (2002). Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion . *Science*. 298: 837-840.
- Melo, E.J.T. & De Souza, W. (1997). Relationship between the host cell endoplasmic reticulum and the parasitophorous vacuole containing *Toxoplasma gondii*. *Cell Struct. Funct.* 22:317-323.
- Melo, E.J.T.; Mayerhoffer, R.O & De Souza, W. (2000). Hydroxyurea inhibits intracellular *Toxoplasma gondii* multiplication. *FEMS Microbiology Letters* 185, 79-82.
- Melo, E.J.T.; Carvalho, T.M.U. & De Souza, W. (2001). Behaviour of microtubules in cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Biocell*. 25:53-59.
- Melo, E.J.T., Góes, A.J.S. & Faria, A.R. (2002) New isolated of thiosemicarbazone and thiazolidin use don intracellular *Toxoplasma gondii*. *Rev. Inst. Medicina Tropical de São Paulo*, 44 (supl.12). XVI Annual Meeting of the Brazilian Society of protozoology, Caxambu, MG.

- Melo, E.J.T. & Beiral, H.J. (2003). Effect of hydroxyurea on the intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36:1-5.
- Mercier, C.; Cesbron-Delauw, M.F. & Sibley, L.D. (1998). The amphipathic alpha helices of the *Toxoplasma* protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *J. Cell. Sci.* 111:2171-2180.
- Mercier, C.; Dubremetz, J.F.; Rauscher, B.; Lecordier, L.; Sibley, L.D. & Cesbron-Delauw, M.F. (2002). Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol. Biol. Cell.* 13:2397-2409.
- Mineo, J.R.; McLeod, R.; Mack, D.; Smith, J.; Khan, I.A.; Ely, K.H.; Kasper, L.H. (1993). Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P-30) inhibit infection of host cells are produced in murine intestine after peroral infection. *J. Immunol.* 150: 3951-3964.
- Mineo, J.R. & Kasper, L.H. (1994). Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Exp. Parasitol.* 79: 11-20.
- Mondragon, R.; Meza, I. & Frixione, E. (1994). Divalent cation and ATP dependent motility of *Toxoplasma gondii* tachyzoite after mild treatment with trypsin. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41: 330-337.
- Monteiro, V.G.; Melo, E.J.T.; Attias, M. & De Souza, W. (2000). Morphological changes during conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites treated with calcium ionophore. *J. Structural Biology.* 136:181-189.
- Montoya, J.G. & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Seminars. The Lancet.* 363: 1965-1976.

- Moore, E.C.; Zedeck, M.S.; Agrawal, K.C. & Sartorelle, A.C. (1970). Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by 1-Formylisoquinoline thiosemicarbazone and related compounds. *Biochemistry* vol. 9 n°23.
- Moore, E.C. & Hurlbert, R.B. (1989). The inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea, guanazole and pyrazoloimidazole (IMPY). *Inhibitors of Ribonucleoside Diphosphate Reductase Activity*. pp 165-201 (Cory, J.G and Cory, eds.). Pergamon Press, Oxford.
- Moreno, S.N. & Docampo, R. (2003). Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol*, 6:359-364.
- Morizaki, J.H.; Heuser, J.E. & Sibley, L.D. (1995). Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J. Cell. Sci.* 108:2457-2464.
- Morrisette, N.S.; Bedian, V.; Webster, P. & Roos, D.S. (1994). Characterization of extreme apical antigens from *Toxoplasma gondii*. *Experimental Parasitology*. 79: 445-459.
- Morrisette, N.S.; Murray, J.M. & Roos, D.S. (1997). Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* 110:35–42.
- Morrisette, N.S. & Sibley, L.D. (2002). Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:21-38.
- Moudy, R.; Manning, T.J. & Beckers, C.J.M (2001). The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 276:41492-41501.
- Mozzatto, L. & Procianoy, R.S. (2003). Incidence of congenital toxoplasmosis in southern Brazil: a prospective study. *Rev. Inst. Med. Trop.* 45:147-51.

- Ngo, H.M.; Hoppe, H.C. & Joiner, K.A. (2000). Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion. *Trends. Cell. Biol.*10:67–72.
- Nichols, B.A. & O'Connor, G.R. (1981). Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. *Lab. Invest.* 44: 324-335.
- Nichols, B.A.; Chiappino, M.L. & O'Connor, G.R. (1983). Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.* 83: 85-98.
- Nichols, B.A. & Chiappino, M.L. (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* 34: 217-226.
- Nichols, B.A.; Chiappino, M.L. & Pravesio, C.E.N. (1994). Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 80:91–98.
- Ogino, N. & Yonededa, C. (1966). The fine structure and mode of division of *Toxoplasma gondii*. *Arch. Ophthalmol.* 75:218–227.
- Ortega-Barria & Boothroyd. J.C. (1999). A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *J Biol Chem* 274: 1267-1276.
- Ossorio, P.N.; Schwartzman, J.D. & Boothroyd, J.C. (1992). A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50: 1-15.
- Passos, C.A. & Melo, E.J.T. (1999). Ultrastructural effects of paclitaxel on intracellular *Toxoplasma gondii*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 94 (suppl.) XV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, Caxambu, MG.*

- Pfefferkorn, E.R. (1990). Cell biology of *Toxoplasma gondii*. In *Modern Parasite Biology*. Ed. Wyler, D.J., NY, USA. pp.26-50.
- Pinder, J.C.; Fowler, R.E.; Bannister, L.H.; Dulzewski, A.R. & Mitchell, G. (2000). Motile systems in malaria merozoites: how is the red blood cell invaded? *Parasitol. Today*. 16:240–245.
- Rajapakse, R.; Mousli, M.; Pfaff, A.W.; Uring-Lambert, B.; Marcellin, L.; Bronner, C.; Jeanblanc, M.; Villard, O.; Letscher-Bru, V.; Klein, J. & Candolfi, E. (2005). 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induces splenocyte apoptosis and enhances BALB/c mice sensitivity to toxoplasmosis. *Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 96: 179-185.
- Robert, R.; de La Jarrige, P.L.; Mahaza, C.; Cottin, J.; Marot-Leblond, A. & Sentet, J.M. (1991). Specific binding of neoglycoproteins to *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Infect. Immun.* 59:4670-4673.
- Robinson, D.N., & Spudich, J.A. (2000). Towards a molecular understanding of cytokinesis. *Trends. Cell. Biol.* 10:228–237.
- Rodrigues, J.C.F; Attias, M.; Rodriguez, C.; Urbina, J.A. & De Souza, W. (2002). Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a  $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyl transferase inhibitor on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonenses*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:487-4899.
- Russell, D.G. & Burns, R.G. (1984). The polar ring of coccidian sporozoites: a unique microtubule-organizing centre. *J. Cell. Sci.* 65:193–207.
- Ryning, F. & Remington, J.S. (1998). Effect of cytochalasin D on *Toxoplasma gondii* cell entry. *Infect. Immun.* 20:739-743.
- Saffer, L.D.; Mercerau-Puijalon, O.; Dubremetz, J.F. & Schwartzman, J.D. (1992). Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by

immunolectron microscopy during and after host cell penetration. *J. Protozool.* 39:526-530.

Schwartzman, J.D. & Pfefferkorn, E.R. (1983). Immunofluorescence localization of myosin at the anterior pole of coccidian *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* 30:657-661.

Schwartzman, J.D.; Krug, E.C.; Payne, M.R. & Binder, L.I. (1985). Detection of the microtubule cytoskeleton of the coccidian *Toxoplasma gondii* and the hemoflagellate *Leishmania donovani* by monoclonal antibodies specific for beta-tubulin. *J. Protozool.* 32:747-749.

Shaw, M.K.; Compton, H.L.; Roos, D.S. & Tilney, L.G. (2000). Microtubules, but not actin filaments, drive daughter cell budding and cell division in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Sci.* 113:1241–1254.

Sheffield, H.G. & Melton, M.L. (1968). The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 54: 209- 226.

Sibley, L.D.; Krahenbuhl, J.L. & Weidner, E. (1985). Lymphokine activation of J774G8 cells and mouse peritoneal macrophages challenged with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 49:760–764.

Sibley, L.D.; Krahenbuhl, J.L.; Adams, G.M. & Weidner, E. (1986). *Toxoplasma* modifies macrophages phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J. Cell. Biol.* 103:867-871.

Sibley, L.D. (1993). Interactions between *Toxoplasma gondii* and its mammalian host cells. *Seminars in Cell. Biology.* 4:335-344.

Sibley, L.D. (1995). Invasion of vertebrate cell by *Toxoplasma gondii*. *Trends Cell Biol* 5: 129-132.

Sibley, L.D.; Niesman, I.R.; Parmley, S.F. & Cesbron-Delauw, M.F. (1995). Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulovesicular network in host cell 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.* 8:12-14.

Silva, S.R.; Meirelles, S.S. & De Souza, W. (1982). Mechanism of the entry of *Toxoplasma gondii* into vertebrate cells. *J. Submicrosc. Cytol.* 14:471-482.

Silva, M.J.; Alves, A.J. & Nascimento, S.C. (1998). Synthesis and Cytotoxic activity of N-substituted thiosemicarbazones of 3-(3,4-methylenedioxy)-Phenilpropanal. *IL. Farmaco.* 53:241-243.

Sinai, A.P.; Webster, P. & Joiner, K.A. (1997). Association of host cell mitochondria and endoplasmic reticulum with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole. *J.Cell. Sci.* 110: 2117-2128.

Sinai, A.P. & Joiner, K.A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J. Cell. Biol.* 154:95-108.

Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates.* 3: 155-166.

Soldati, D. & Meissner, M. (2004). *Toxoplasma* as a novel system for motility. *Curr. Opin. In. Cell. Biol.* 16:1-9

- Speer, C.A.; Dubey, J.P.; Blixt, J.A. & Prokop, K. (1997). Time lapse vídeo microscopy and ultrastructure of penetrating sporozoites, types 1 and 2 parasitophorous vacuoles and the transformation of sporozoites to tachyzoites of the VEG strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 83:565-574.
- Stommel, E.W., Kenneth, H.E., Schwartzman, J.D. & Kasper, L.H. (1997). *Toxoplasma gondii*: dithiol induced  $Ca^{2+}$  flux causes egress of parasites from the parasitophorous vacuole. *Exp. Parasitol.* 87:88–97.
- Striepen, B.; Crawford, M.J.; Shaw, M.K.; Tilney, L.G.; Seeber, F. & Roos, D.S. (2000). The plastid of *Toxoplasma gondii* is divided by association with the centrosomes. *J. Cell. Biol.* 151:1423-1434.
- Taylor, W.R.; Agarwal, M.L.; Agarwal, A.; Stacey, D.W. & Stark, G.R. (1999). P53 inhibits entry into mitosis when DNA synthesis is blocked. *Oncogene*.18: 283-295.
- Tenant-Flowers, M.; Boyle, M.J.; Carey, D.; Marriot, D.J.; Harkness, J.L.; Penny, R. & Cooper, D.A. (1991). Suphadiazine desensitization in patients with AIDS and cerebral toxoplasmosis. *AIDS.* 5:311-315.
- Tenório, R.P.; Carvalho, C.S.; Pessanha, C.S.; Lima, J.G.; De Faria, A.R.; Alves, A.J.; Melo, E.J.T. & Góes, A.J.S. (2005). Synthesis of thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones derivatives and their in vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity. *Bioorg. Med. Chem. Letters.* 15:2575-2578.
- Thelander, L. & Reichard, P. (1979). Reduction of ribonucleotides. *Annu. Rev. Biochem.* 48:133-158.
- Trotter, P.J. & Voelker, D.R. (1994). Lipid transport processes in eukaryotic cells. *Biophys. Acta.* 1213: 241-262.

- Urbina, J.A.; Vivas, J.; Lazardi, K.; Molina, J.; Payares, G.; Piras, M.M. & Piras, R. (1996). Antiproliferative effects of  $\Delta^{24(25)}$ sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* studies. *Chemotherapy*. 42:294-307.
- Urbina, J.A.; Visbal, G.; Cotreras, L.M.; McLaughlin, G. & Docampo, R. (1997). Inhibitors of  $\Delta^{24(25)}$ sterol methyl transferase block sterol synthesis and cell proliferation in *Pneumocystis carinii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1428-1432.
- Walcourt, A.; Loyevsky, M.; Lovejoy, D.B.; Gordeuk, V.R. & Richardson, D.R. (2004). Novel aroylhydrazones and thiosemicarbazones iron chelators with anti-malarial activity against chloroquine-resistant and sensitive parasites. *Intern. J. Biochem. Cell. Biol.* 36:401-407.
- Wan, K.L.; Carruthers, V.B.; Sibley, L.D. & Ajioka, J.W. (1997). Molecular characterization of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 84: 203-214.
- Weber, G. (1983). Biochemical strategy of cancer cells and the design of chemotherapy. *Cancer Res.* 43:3466-3492.
- Werk, R. (1985). How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? *Rev. Infect. Dis.* 7: 449-457.
- Wetzel, D.M.; Hakansson, S.; Hu, K.; Roos, D. & Sibley, L.D. (2003). Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. *Mol. Biol. Cell.* 14:396-406.
- Wilson, R.J.M.; Tsai, V. & Remington, J.S. (1991). Failure to trigger the oxidative burst of normal macrophage. Possible mechanisms for survival of intercellular pathogens. *J. Exp. Med.* 151:328-3

Yasuda, T.K.; Yagita, T.N. & Endo, T. (1988). Immunocytochemical localization of actin in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 75:107-113.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)