

Leandro Lemgruber Soares

Estrutura e Formação do Cisto Tecidual
de *Toxoplasma gondii*

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Leandro Lemgruber Soares

Estrutura e Formação do cisto tecidual de *Toxoplasma gondii*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito necessário à obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientadores:
Rossiane C. Vommaro
Wanderley de Souza

Rio de Janeiro
2010

Lemgruber, Leandro

Estrutura e formação do cisto tecidual de *Toxoplasma gondii* Rio de Janeiro, 2010.
X, 133f.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Biofísica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2010.

Orientadores: Rossiane C. Vommaro
Wanderley de Souza

1. *Toxoplasma gondii* 2. Cisto 3. Criofratura 4. Microscopia Eletrônica
5. Bradizoítos
Universidade Federal do Rio de Janeiro. I. Título

Este trabalho foi realizado sob a orientação dos Profs. Rossiane C. Vommaro e Wanderley de Souza, no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho e pelo Prof. Pietro Lupetti, do Departamento de Biologia Evolutiva na Universidade de Siena, Itália.

Apoio Financeiro: CNPq e FAPERJ.

Agradecimentos

Aos meus pais, Maria Luisa (*in memorium*) e Marcus, por todo amor e carinho que eles me deram.

À uma pessoa muito especial, minha amada Joana. Sem você não teria chegado onde cheguei nem teria vivido tão intensamente como vivi. Tenho o privilégio de dividir todos os meus sonhos e alegrias com você. Te amo!

Às minhas tias Nair e Sandra, e aos meus primos Gustavo e Alexandre. Eu tive muita sorte em ter vocês como Família. Não há pessoas melhores.

À minha querida orientadora Rossiane, obrigado por ter me suportado por todos estes anos.

Às minhas “irmãs” Érica, Sarah e Tati, por toda a força que me deram nos momentos que passamos juntos.

Ao Edmir e à Mona por terem me aceitado como um filho. E aos “primos” Rafael e Adolfo pelas risadas, e claro à querida Luna.

Aos amigos Celso, Gustavo, Miria e Emile. Pessoas maravilhosas com quem pude ter o prazer de conviver no subsolo do Fundão.

Às queridas professoras (e ao professor) Narcisa, Márcia, Técia, Sonia, Kildare e Cris. Obrigado por todos os seus conselhos e dicas neste longo trajeto.

Às minhas grandes amigas Juju (nossa mais recente professora), Tati e Lia.

Ao chefe do laboratório Wanderley, por ter liberado verbas para o projeto e pela co-orientação durante a tese.

Aos queridos companheiros de biotério e também Toxoplasmáticos Miguel, Renata, Karla e Lucio.

Ao grande amigo Leonardo Salgado e ao Serginho (Inmetro) pela ajuda nos momentos de grande necessidade.

Ao amigo Bruno Azevedo pela amizade e colaboração.

Aos grandes amigos e colegas do Lab. (mesmo àqueles que longe, ainda estão presentes) Allan, Aline, Ana Paula, Bosco, Carol Cattapreta, Cazuza, Dani C., Didi, Iara, Ju Vidal, Lissa, Loraine, Marcel, Nete, Noemia, Silvia, Thiago e Wendel. Obrigado.

Aos integrantes dos laboratórios do Prof. Lupetti (Gaia, Elisa, Eugenio, Francesco, Fabio, David), da Prof^a Ana Martinez (ICB/UFRJ), do Prof. Eliot Kitajima (ESALQ/USP) e da Prof^a Patrícia Gardino (IBCCF/UFRJ).

"Butterflies and Hurricanes"

(Muse)

change,
everything you are
and everything you were
your number has been called
fights, battles have begun
revenge will surely come
your hard times are ahead

best,
you've got to be the best
you've got to change the world
and you use this chance to be heard
your time is now

Resumo

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório, agente etiológico da toxoplasmose. O encistamento é uma etapa fundamental do seu ciclo de vida, permitindo o seu escape do sistema imune do hospedeiro intermediário, sendo uma das vias de transmissão do parasito entre os hospedeiros. Uma caracterização estrutural detalhada das etapas que ocorrem durante a formação do cisto tecidual e pelo próprio parasito é fundamental para um melhor entendimento da cistogênese. A parede cística apresentou aspecto filamentososo, com estruturas semelhantes a poros na sua superfície, além de túbulos e uma grande quantidade de vesículas. Estes filamentos estavam organizados em duas camadas: uma voltada para o exterior, com um aspecto mais compacto; e uma interna, voltada para a matriz do cisto, com uma organização mais frouxa. Não encontramos seqüências das enzimas quitina e quitina sintase. Esta parede se mostrou permeável ao fluoróforo Lucifer Yellow, que se acumulou na matriz do cisto. Diferentes preparações de microscopia eletrônica mostraram a presença de túbulos e vesículas de diferentes diâmetros na matriz do cisto. Grandes vesículas, contendo material granular de natureza glicídica, foram observadas sendo secretadas na região posterior dos bradizoítas e também interagindo com a parede cística. Os túbulos estavam organizados em uma rede conectando os bradizoítas. Os túbulos e algumas vesículas apresentaram marcação com os anticorpos anti GRA1, 3 e 7. Análise morfométrica mostrou que há uma variação do volume ocupado por algumas organelas, como a mitocôndria e o apicoplasto, que apresentaram uma redução no volume ocupado, e micronemas que apresentaram um aumento, quando comparamos bradizoítos com taquizoítos. As róptrias de taquizoítos e de bradizoítos apresentaram domínios distintos, representados por regiões de eletrondensidade diferenciada. Partículas intramembranares de diferentes dimensões estavam distribuídas em fileiras paralelas nas faces fraturadas da membrana desta organela, além de poros. Estabelecemos o protocolo de encistamento *in vitro* das cepas Me49 e EGS em culturas epiteliais e de fibroblasto. Cortes ultrafinos deste material mostraram que a parede cística apresentava o mesmo aspecto que a parede de cistos isolados de cérebro de camundongos. Organelas como mitocôndrias e perfis de retículo endoplasmático, e elementos de citoesqueleto da célula hospedeira localizaram-se próximos ao cisto em formação.

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligatory intracellular parasite, etiologic agent of human toxoplasmosis. The encystation process is a key step of its life cycle, allowing the parasite to escape from the host immune system, and permitting the transmission among intermediate and definitive hosts. A detailed characterization of the formation and structure of the cyst, and the modifications, which the parasite suffers during the encystation, are essential for a better knowledge of the toxoplasmosis, and may open new therapeutical possibilities. The cyst wall presented a filamentous aspect, with some pore-like structures on its surface. These filaments were organized in two layers: a compact one, facing the exterior; and one more loosen, facing the cyst matrix. Within the cyst wall, we observed tubules and a great amount of vesicles. We found no sequence for chitinase and chitin synthase enzymes. The cyst wall was permeable to small molecules, as we observed an accumulation of Lucifer Yellow in the cyst matrix. The cyst matrix presented tubules and vesicles of different sizes. Large vesicles, with a granular material in their lumen, of glycidic nature, were observed. These vesicles were secreted by the bradyzoites at their posterior pole, and were also observed interacting with the cyst wall. The tubules were organized in a network, connecting the bradyzoites. These tubules and some small vesicles were positively labeled with anti GRA1, 3 and 7 antibodies. Morphometrical analysis showed that the volume occupied by some organelles was different in the tachyzoites and in the bradyzoite forms. For example, the mitochondrion and the apicoplast presented a reduction on their relative volume in bradyzoites when compared to tachyzoites. On the other hand, micronemes presented an increase in their relative volume. Rhoptries, important organelles in host cell invasion, presented difference domains represented by sessions of different electron densities in both infective forms. Intramembranous particles of different diameters were distributed in parallel rows when we observed metal replicas of the fractured faces of the rhoptries membrane. Some pore-like structures were also observed. We settled the *in vitro* encystation protocol for the Me49 strain in both epithelial cell line and fibroblasts. Ultrathin section of these materials showed the cyst wall structured in a similar way that is observed in isolated mature cysts. Host cell organelles (mitochondria and endoplasmic reticulum) and cytoskeletal components were observed in close proximity to the encysted parasites.

Lista de Abreviaturas

- AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida
BAG – antígeno de bradizoíta
CST1 – glicoproteína do cisto
DBA – aglutinina de *Dolichos biflorus*
DMSO – dimetilsulfóxido
ENO - enolase
FIB – desbastamento com feixe de íons concentrado
FITC - isotiocianato de fluoresceína
GRA – proteína de grânulos densos
IFN- γ - interferon gama
IL-12 – interleucina 12
LDH - lactato desidrogenase
MAG1 – proteína de matriz do cisto
MIC – proteína de micronemas
PBS – solução salina tamponada com fosfato
PI – partícula intramembranar
ROP – proteína do bulbo das róptrias
RON – proteína do pescoço das roptrias
SAG - antígeno de superfície
SRS – sequência relacionada a SAG
TgNHE - trocador Na^+/H^+
TCA - ciclo do ácido tricarbóxico
TNF- α - fator de necrose tumoral α
WGA – aglutinina de germem de trigo

Lista de Esquemas, Figuras e Tabelas

Esquema 1 – página 2
Esquema 2 – página 4
Esquema 3 – página 5
Esquema 4 – página 9
Esquema 5 – página 15
Esquema 6 – página 18
Esquema 7 – página 92
Figura 1 – página 43
Figura 2 – página 46
Figura 3 – página 47
Figura 4 – página 48
Figura 5 – página 49
Figura 6 – página 51
Figura 7 – página 52
Figura 8 – página 55
Figura 9 – página 56
Figura 10 – página 57
Figura 11 – página 58
Figura 12 – página 59
Figura 13 – página 60
Figura 14 – página 61
Figura 15 – página 62
Figura 16 – página 63
Figura 17 – página 65
Figura 18 – página 66
Figura 19 – página 67
Figura 20 – página 70
Figura 21 – página 71
Figura 22 – página 72
Figura 23 – página 73
Figura 24 – página 76
Figura 25 – página 79

Figura 26 – página 80

Figura 27 – página 81

Figura 28 – página 82

Figura 29 – página 83

Figura 30 – página 84

Figura 31 – página 95

Figura 32 – página 101

Tabela 1 – página 45

Tabela 2 – página 69

Tabela 3 – página 75

Sumário

Introdução.....	1
1. O Filo Apicomplexa.....	1
2. <i>Toxoplasma gondii</i>	1
2.1 Considerações Gerais.....	1
2.2 Ciclo Biológico.....	1
3. Toxoplasmose.....	6
3.1 Epidemiologia e Transmissão.....	6
3.2 Aspectos Clínicos.....	8
4. Organização ultraestrutural de <i>Toxoplasma gondii</i>	9
4.1 Forma Taquizoíta.....	9
i) Película.....	10
ii) Citoesqueleto.....	10
iii) Endomembranas.....	11
iv) Mitocôndria.....	11
v) Apicoplasto.....	11
vi) Acidocalcissomo.....	12
vii)Corpos Lipídicos.....	12
viii) Micronemas.....	13
ix) Róptrias.....	13
x) Grânulos Densos.....	13
4.2 Forma Bradizoíta.....	14
5. Diferenças metabólicas e de expressão gênica entre taquizoítos e bradizoítos..	15
6. Infecção da Célula Hospedeira.....	16
6.1 Invasão.....	16
6.2 Formação do Vacúolo Parasitóforo.....	18
6.3 Modificações na Célula Hospedeira.....	19
6.4 Rede Intravacuolar.....	20
7. O cisto tecidual.....	21
8. Encistamento <i>in vitro</i>	22
9. Justificativa do projeto.....	24

Objetivos.....	27
Material e Método.....	28
1. Manutenção dos parasitos.....	28
1.1 Cepa Me49.....	28
1.2 Cepa RH.....	28
1.3 Cepa EGS.....	29
2. Cultivo e manutenção da célula hospedeira.....	29
2.1 Linhagem Epitelial.....	29
2.2 Fibroblasto.....	30
3. Isolamento dos cistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	30
4. Permeabilidade da parede cística.....	30
5. Estabelecimento do processo de encistamento <i>in vitro</i>	31
5.1 Linhagem Epitelial.....	31
5.2 Fibroblasto.....	31
6. Microscopia de Fluorescência.....	32
7. Microscopia Eletrônica de Vareadura.....	32
i) Convencional.....	32
ii) De Emissão de Campo.....	33
8. Desbastamento com feixe de íons concentrado (FIB)	34
9. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	34
A – Fixação convencional.....	34
B – Citoquímica de carboidratos.....	35
C – Citoquímica de lipídeos.....	36
D – Imunocitoquímica.....	36
i) Em cortes de resina.....	36
ii) Em Crio-cortes.....	38
E – Avaliação de espessura e diâmetro da parede e demais elementos dos cistos isolados.....	38
10. Morfometria.....	39
11. Criofratura.....	39
i) Convencional.....	39
ii) Localização de colesterol em preparação de criofratura.....	40
12. Congelamento rápido seguido de criofratura e <i>etching</i> profundo.....	40
13. Pesquisa de seqüências gênicas e alinhamento gênico.....	41

Resultados.....	42
1. Caracterização da ultraestrutura do cisto.....	42
1.1 Visão geral.....	42
1.2 A parede cística.....	44
1.3 A matriz do cisto.....	53
2. Diferenças morfológicas entre os bradizoítos e os taquizoítos.....	64
2.1 Róptrias.....	64
2.2 Comparação morfométrica entre taquizoítos e bradizoítos.....	74
3. Encistamento <i>in vitro</i>	77
4. Genes de quitina sintase e quitinase.....	85
Discussão.....	86
O cisto tecidual de <i>Toxoplasma gondii</i>	86
Diferenças morfométricas.....	96
As róptrias.....	98
Encistamento <i>in vitro</i>	102
Considerações Finais.....	105
Conclusões.....	106
Referências.....	107

Introdução

1 – O Filo Apicomplexa

O filo Apicomplexa agrega protozoários parasitos de grande importância tanto em saúde pública quanto econômica: *Eimeria spp.* (patógeno de gado, ovelhas e aves); *Plasmodium spp.* (agente da malária humana, que atinge milhões de pessoas por ano); *Theileria spp.* (infecta gado, principalmente na África); *Babesia sp.* (infecta animais e humanos); *Cryptosporidium spp.* (patógeno humano, transmitido através de água contaminada causando diarreia) e, *Toxoplasma gondii* (agente etiológico da toxoplasmose humana e de animais e de aves) (Morrissette e Sibley, 2002). Estes parasitos apresentam características em comum como a presença de estruturas que formam o complexo apical. Dentre estas estruturas podemos citar os micronemas e as róptrias (organelas secretórias) e componentes do citoesqueleto, como os anéis polares e o conóide. Além destas estruturas, protozoários deste filo apresentam outra organela secretória, os grânulos densos.

2 – *Toxoplasma gondii*

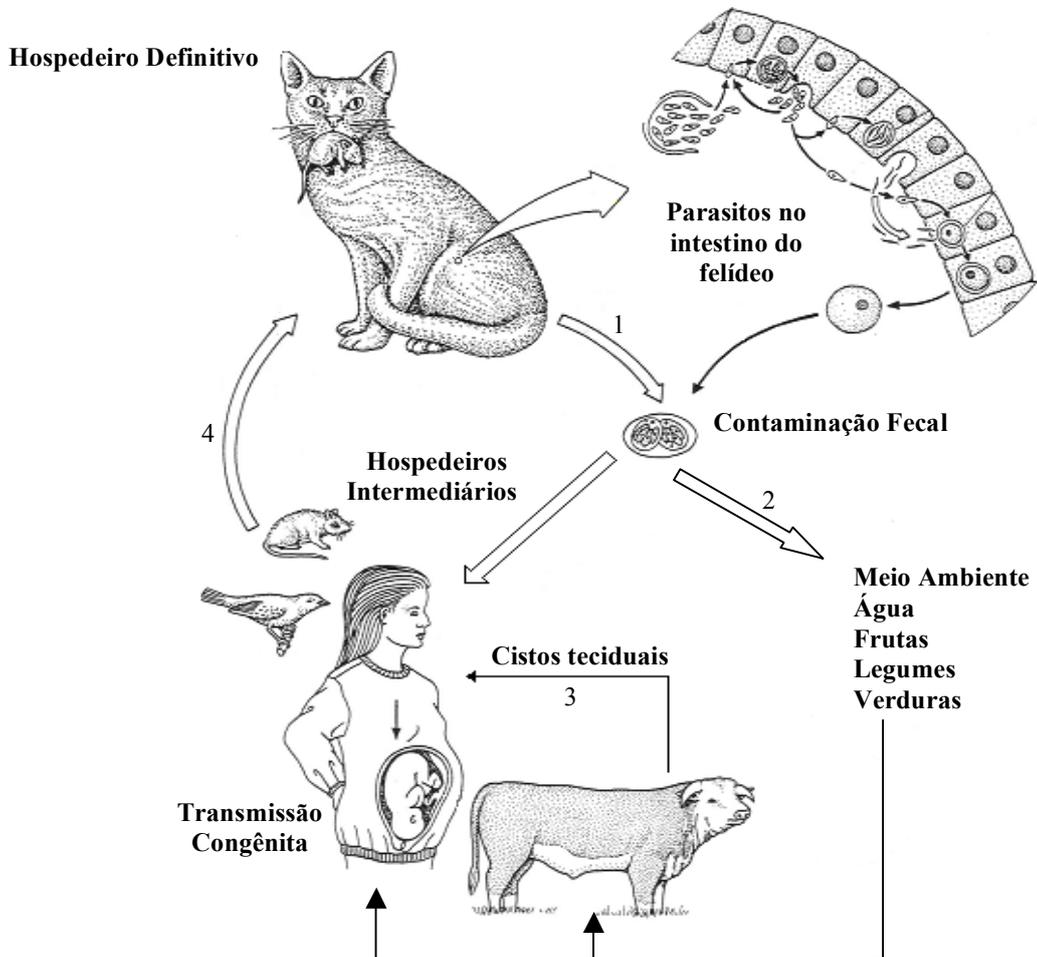
2.1 - Considerações Gerais

O *Toxoplasma gondii* foi descrito, simultaneamente, por Nicolle e Manceaux na Tunísia e por Splendore em São Paulo, em 1908. É um protozoário parasito intracelular obrigatório, capaz de infectar virtualmente qualquer célula nucleada de vertebrados homeotérmicos.

2.2 - Ciclo Biológico

Existem três formas infectivas do parasito: taquizoíta (forma multiplicativa da fase aguda), bradizoíta (forma de multiplicação lenta, presente em cistos teciduais,

característicos da fase crônica) e esporozoíta (encontrada em oocistos liberados nas fezes de felídeos). Estes estágios evolutivos estão relacionados em um complexo ciclo de vida (Esquema 1). Os hospedeiros intermediários podem ser representados por qualquer animal homeotérmico e os hospedeiros definitivos se restringem aos felídeos.



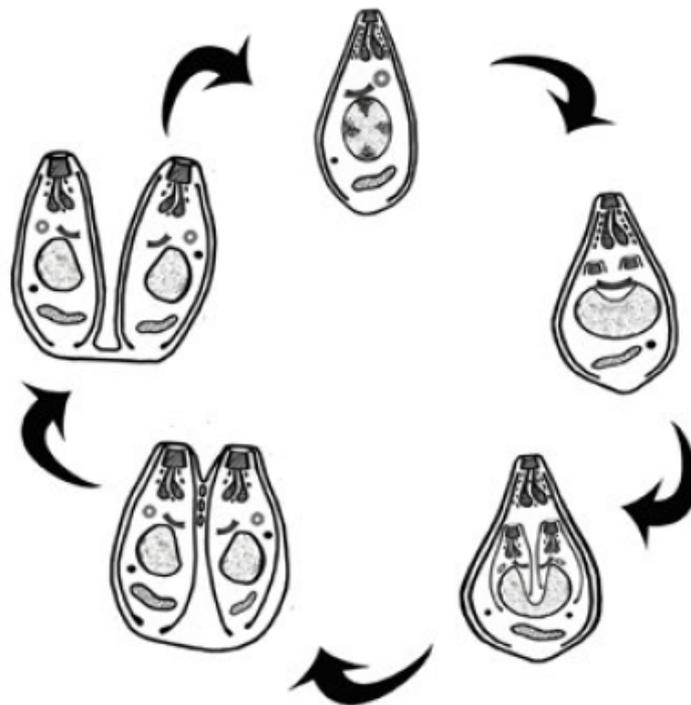
Esquema 1 – Esquema retratando o ciclo biológico do *T. gondii*. Os felídeos são os únicos hospedeiros definitivos, que albergam a fase sexuada do ciclo, resultando na liberação de oocistos nas suas fezes (1). Após a esporulação no meio ambiente, os oocistos passam a ser infectivos e podem infectar novos hospedeiros definitivos ou intermediários, através da ingestão de água ou alimentos contaminados com as fezes (2). Nos hospedeiros intermediários ocorrem duas fases na infecção - uma aguda, seguida de uma crônica, formando cistos teciduais, principalmente no tecido nervoso e muscular. Estes cistos podem ser transmitidos para outros hospedeiros intermediários ou para definitivos através do consumo de carne contaminada (3 e 4). Caso a fase aguda ocorra durante a gestação, taquizoítos podem atravessar a placenta e infectar o feto (transmissão congênita). Adaptado de William Ober e Claire Garrison – Foundations of Parasitology.

A ingestão de oocistos ou carne contendo cistos pelos felídeos após sucessivas diferenciações dos parasitos ocorre o início ao ciclo sexuado, conhecido como gamogonia, nas células epiteliais do intestino delgado. Após a formação de gametas, seguido de fecundação e formação do oocisto, que é liberado no lúmen intestinal. Os oocistos são, então, liberados nas fezes e, após contato com o ar atmosférico, sofrem esporogonia (esporulação), tornando-se infectivos (Tenter *et al.*, 2000). Os oocistos apresentam uma alta capacidade de resistência a processos de congelamento e ambientes não favoráveis, permanecendo viáveis por períodos de até dezoito meses, facilitando sua disseminação (Dubey, 2004). Apesar de parasitar diferentes hospedeiros intermediários, como já mencionado o *T. gondii* só realiza seu ciclo sexuado nos membros da família dos felídeos.

O ciclo assexuado do *T. gondii* inicia-se quando um animal de sangue quente ou o homem ingere alimentos contaminados com oocistos ou carne crua ou mal passada contendo cistos teciduais. Nestes animais, denominados de hospedeiros intermediários, duas fases ocorrem: a aguda e a crônica. Na fase aguda, formas taquizoítas do *T. gondii* se multiplicam rápida e sucessivamente em diferentes células hospedeiras nucleadas, se disseminando por vários tecidos. Após a ativação do sistema imunológico, estas formas se diferenciam em bradizoítos, que darão origem aos cistos teciduais, estabelecendo assim a fase crônica da infecção. É importante ressaltar que o ciclo assexuado também acontece nos tecidos dos felídeos, como em qualquer outro hospedeiro.

Os taquizoítos no interior das células hospedeiras se localizam em vacúolos no citoplasma (discutido mais adiante), promovendo um processo de multiplicação rápida e assexuada. Dois taquizoítos originam-se dentro da célula-mãe, que se degenera ao final do processo de divisão celular (Esquema 2) (Sheffield e Melton, 1968). Este processo de “brotamento interno” é chamado de endodiogenia e acontece dentro das células

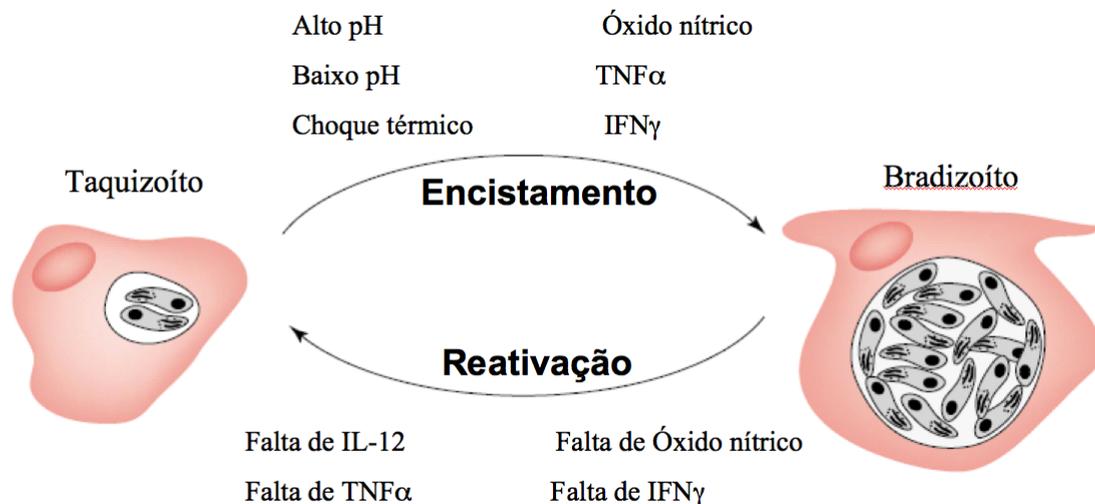
nucleadas dos hospedeiros intermediários. Durante estas sucessivas divisões celulares, os parasitos se arranjam em forma de rosácea dentro do vacúolo que os abriga. Ao evadirem da célula, estes parasitos causam a lise celular. Devido à sua eficiente capacidade reprodutiva, os taquizoítos causam uma infecção generalizada, normalmente fatal se não forem controlados pelo sistema imunológico do hospedeiro (Blader e Saeij, 2009).



Esquema 2 – Desenho esquemático do processo de replicação do *T. gondii* conhecido como endodiogenia. Neste processo duas células filhas se originam dentro de uma célula mãe (Retirado de De Souza *et al.*, 2010).

A fase crônica do ciclo no hospedeiro intermediário é assintomática, ocorrendo a diferenciação da forma taquizoíta em bradizoíta e, conseqüentemente, a modificação dos vacúolos contendo os taquizoítas em cistos teciduais (Weiss e Kim, 2000) (Esquema 3), permitindo que o parasito escape do sistema imune do hospedeiro. A presença de efetores imunes, como IFN- γ , óxido nítrico, IL-12 e TNF- α , induziriam a

diferenciação dos parasitos em uma forma de resistência, permanecendo viáveis no hospedeiro (revisto em Lyons *et al.*, 2002). Devido à baixa imunidade em pacientes imunossuprimidos (com AIDS ou em tratamento com imunossupressores) pode ocorrer um processo de reativação da fase aguda, onde cistos rompem e os bradizoítos se diferenciam em taquizoítos.



Esquema 3 – Esquema do processo de diferenciação dos taquizoítas presentes em vacúolos em bradizoítas encontrados em cistos teciduais. (Adaptado de Lyons *et al.*, 2002).

Durante a diferenciação de taquizoítos em bradizoítos ocorrem mudanças na expressão de genes e proteínas diminuindo tanto a taxa de replicação do parasito, quanto à exposição de moléculas imunogênicas na sua superfície (revisto em Lyons *et al.*, 2002). Durante este processo de diferenciação o parasito aumentaria a expressão de genes que fariam com que a célula permanecesse na fase G0 do ciclo celular (revisto em Blader e Saeij, 2009). Os cistos teciduais, apesar de encontrados em diferentes órgãos, tem uma maior incidência nos tecidos nervoso e muscular (revisto em Weiss e Kim, 2000), provavelmente por estes tecidos serem formados de células altamente diferenciadas, que permanecem em G0.

Popiel e colaboradores (1996) demonstraram *in vitro* que os bradizoítos possuem uma maior resistência à pepsina ácida e tripsina, sugerindo que estas formas poderiam atravessar o trato digestivo sem perdas significativas da sua capacidade de infecção. Dzierszinski e colaboradores (2004) observaram que *in vitro* a disseminação dos cistos poderia ocorrer de duas formas: quando os bradizoítos saem do cisto e infectam células vizinhas, ou quando há fissão do cisto, originando um outro.

Os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da toxoplasmose só apresentam eficácia na forma taquizoíta. Há a dificuldade das drogas atingirem o interior dos cistos, por terem de atravessar a parede cística, além dos bradizoítos possuírem um metabolismo mais lento que os taquizoítos (Gross *et al.*, 1996 e Samuel *et al.*, 2003).

3 - Toxoplasmose

3.1 – Epidemiologia e Transmissão

A toxoplasmose é uma doença cosmopolita, apesar de sua soroprevalência variar de região para região. Nos Estados Unidos e na Grã-Bretanha a porcentagem da população infectada é de 16 a 40%, enquanto que na Europa e América do Sul fica entre 50 e 80% (revisto em Hill *et al.*, 2005). A toxoplasmose é uma das doenças mais letais para pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), sendo responsável por 10% dos óbitos anuais nos Estados Unidos e por 30% na Europa (Luft e Remington, 1992). Na França, 84% das gestantes apresentam soropositividade para *T. gondii*, enquanto que em Nova York, são 32% (Dubey e Beattie, 1988) e no Brasil 57% (revisto em Hill e Dubey, 2002). Esta alta soroprevalência é alarmante, visto o risco de óbito quando ocorre contaminação do feto.

As duas principais rotas de infecção do parasito no homem são as vias oral e congênita (revisto em Hill *et al.*, 2005). A primeira ocorre principalmente pela ingestão de cistos teciduais (carnes mal passadas e cruas) ou de oocistos (alimentos contaminados ou lavados com água contaminada, ingestão de água contaminada), e a segunda, pela via trans-placentária, da mãe para o feto. Existem, entretanto, alguns relatos de contaminação por transfusão de sangue e seus derivados (Siegel *et al.*, 1971) e ainda, transplante de órgãos, como fígado, rim e medula (revisto em Mele *et al.*, 2002 e Campbell *et al.*, 2006).

Cistos de *T. gondii* podem ser encontrados em animais usados comumente como alimento pelo homem como ovelhas, porcos, cabras, bovinos e coelho. Em alguns animais, como porcos, a soropositividade foi de 47% na Nova Inglaterra (EUA) e em galinhas domésticas no Brasil foi de 30% (revisto em Hill *et al.*, 2005). Recentemente, foi levantada a hipótese de contaminação por ingestão de frutos do mar, como ostras, uma vez que foi demonstrada a resistência de oocistos a água salgada (Dubey, 2004).

Hábitos culturais podem também estar relacionados à infecção por *T. gondii*. O consumo de carnes mal passadas ou mesmo não cozidas foi relacionado ao alto índice de soropositividade entre as gestantes francesas e ao grande número de casos de toxoplasmose ocular na região Sul do Brasil (Dubey e Beattie, 1988 e Glasner *et al.*, 1992). Os principais relatos de casos clínicos de toxoplasmose foram relacionados ao consumo de água contaminada com oocistos, como no Canadá e no Brasil (Aramini *et al.*, 1998, 1999, Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). A presença de felídeos, tanto domésticos como selvagens, estaria relacionada com estes relatos de infecção por ingestão de água contaminada (revisto em Hill *et al.*, 2005).

Acreditava-se que a transmissão transplacentária ocorresse somente quando a mãe fosse infectada pela primeira vez durante a gestação (Remington *et al.*, 1995).

Entretanto, Silveira e colaboradores (2003) reportaram um caso onde uma gestante que tinha sido tratada para toxoplasmose ocular 20 anos antes deu a luz a um feto com retinocoroidite e serologia para toxoplasmose. Estes autores sugeriram, então, que mesmo grávidas com exposição prévia a *T. gondii* podem transmitir o parasita aos fetos.

3.2 – Aspectos Clínicos

A toxoplasmose se apresenta normalmente assintomática para os hospedeiros imunocompetentes. Quando sintomática é caracterizada por linfadenopatia, fadiga, febre, mialgias e dor de garganta. Apesar destas condições serem benignas e autolimitantes, o diagnóstico laboratorial é vital para grávidas, pelo risco de infecção do feto (Hill *et al.*, 2005).

A toxoplasmose em pacientes imunodeprimidos (com AIDS ou em tratamento com imunossupressores) se apresenta mais severa, com quadros de encefalite, pneumonite, hemiparalisia, perda de reflexos, letargia, convulsões e retinocoroidite (menos comum, contudo, quando ocorre é destrutiva) e em alguns casos, coma (Luft e Remington, 1992 e Roberts e McLeod, 1999). A retinocoroidite aguda pode produzir sintomas como visão turva, dor, fotofobia e caso a mácula esteja envolvida, perda da visão central. Assim que a inflamação diminui, a visão melhora, freqüentemente sem recuperação completa da acuidade visual.

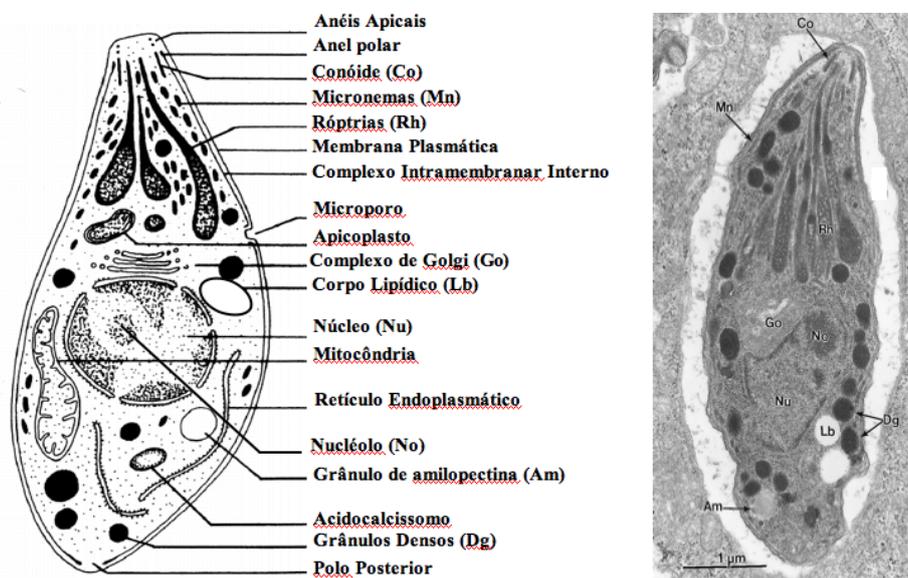
Acredita-se que a severidade da toxoplasmose congênita varie de acordo com o trimestre durante a qual a infecção é adquirida. As manifestações clínicas da toxoplasmose congênita são variadas. Pode não haver seqüelas, ou estas podem se desenvolver e/ou estarem evidentes em diferentes períodos após o nascimento (Remington *et al.*, 1995 e Hill *et al.*, 2005). Quando a infecção ocorre no segundo ou terceiro trimestre da gestação, a criança provavelmente não apresentará problemas

imediatos, mas será soropositivo para o *T. gondii*, contendo cistos na retina, cérebro, miocárdio e músculo esquelético. Mesmo que o indivíduo se mantenha imunocompetente, manifestações clínicas subseqüentes poderão aparecer como retinocoroidite, que se expressa durante a segunda e a terceira década de vida e leve retardo mental (Remington *et al.*, 1995). Em fetos infectados durante os primeiros meses de gestação, os danos clínicos são bem mais graves, com os sintomas aparecendo desde o nascimento ou nos primeiros meses de vida, como hidrocefalia (menos comum), retinocoroidite, convulsões e calcificação intracerebral. Em alguns casos, pode ocorrer o aborto espontâneo ou natimorto (Remington *et al.*, 1995 e Hill *et al.*, 2005).

4 – Organização ultraestrutural de *Toxoplasma gondii*

4.1 – Forma Taquizoíta

O taquizoíta de *T. gondii* (Esquema 4) possui forma de arco, tendo cerca de 8µm de comprimento e 2µm de largura. No seu pólo apical, estão localizadas as estruturas que formam o complexo apical, característico deste filo: os anéis polares, micronemas e as rôptrias. O núcleo localiza-se na posição mediana, logo abaixo do apicoplasto e do complexo de Golgi. O núcleo localiza-se na posição mediana, logo abaixo do apicoplasto e do complexo de Golgi.



Esquema 4 – O desenho à esquerda esquematiza a ultraestrutura do taquizoíta de *T. gondii* observada na micrografia à direita. Adaptado de Dubey *et al.*, 1998.

i) Película

O taquizoíto é envolto por uma estrutura trimembranar – a película. Esta estrutura é formada pela membrana plasmática e pelo Complexo Interno de Membranas (Cintra e De Souza, 1985). A membrana plasmática é contínua ao longo do corpo do *T. gondii*. O complexo interno de membranas é um conjunto de cisternas achatadas, interrompido em alguns pontos, justaposto à membrana plasmática. Na região mediana do *T. gondii* encontra-se o microporo (Nichols *et al.*, 1994), que é formado por uma invaginação da membrana plasmática numa região onde o complexo interno de membranas está interrompido, podendo estar envolvido na ingestão de macromoléculas. Foi sugerido que este complexo seja uma região especializada do retículo endoplasmático, pois foi detectada a atividade da enzima glicose-6-fosfatase no seu interior (De Melo e De Souza, 1997). A este complexo ligam-se os microtúbulos subpeliculares (Morrissette *et al.*, 1997).

ii) Citoesqueleto

Na parte apical do parasito, encontram-se 2 anéis polares apicais e logo abaixo destes, o anel polar posterior. Entre estas duas estruturas, localiza-se o conóide, estrutura formada por tubulina em um arranjo de 9 protofilamentos em forma de vírgula justapostas em arranjo espiralado (Hu *et al.*, 2002). Partindo do anel polar posterior, 22 microtúbulos subpeliculares cobrem 2/3 do corpo do parasito, formando junto com a rede subpelicular o citoesqueleto cortical deste protozoário (de Souza, 1972; Mann e Beckers, 2001; Morrissette e Sibley, 2002; Lemgruber *et al.*, 2009). Esta rede, com filamentos de 10 nm de espessura, é formada pelas proteínas TgIMC1 e 2 e uma recentemente identificada (ID 42.m03481), similares às articulinas de *Euglena gracilis*.

Além destes elementos, há filamentos de actina presentes entre a membrana e o complexo interno de membranas, responsáveis pela movimentação do protozoário.

iii) Endomembranas

O sistema endomembranar do *T. gondii* é formado por um único retículo endoplasmático e um único Complexo de Golgi. O retículo endoplasmático ramifica-se pelo citoplasma do parasito e compõe o envoltório nuclear, compartimento intermediário entre o retículo e o Golgi (Hager *et al.*, 1999). O Complexo de Golgi é formado por 3 a 5 cisternas, localizando-se na área perinuclear (Pelletier *et al.*, 2002).

iv) Mitocôndria

A mitocôndria é única e ramificada, com um grande número de cristas tubulares que sofrem leve constrição na região de fusão à membrana interna (Melo *et al.*, 2000). O genoma mitocondrial é de 6 kb, sendo o menor já descrito (revisto em de Souza *et al.*, 2009). Apesar de apresentar um potencial de membrana ativo (pois se cora com rodamina 123) (Tanabe, 1985), a glicólise é a principal via de produção de energia no *T. gondii* (Denton *et al.*, 1996).

v) Apicoplasto

O *T. gondii* apresenta uma organela única, o apicoplasto, provavelmente resultante de uma endossimbiose secundária, local de síntese de ácidos graxos do tipo II, biosíntese de isoprenóides e algumas enzimas do metabolismo de carboidratos (Köhler *et al.*, 1997; Gleeson, 2000, Mazumdar *et al.*, 2006; Fleige *et al.*, 2007). Esta organela, que apresenta um genoma de 35 kb e quatro membranas a circundando, localiza-se próxima do complexo de Golgi. Recentemente, foi caracterizada a presença de um

translocador da membrana interna (TIC) na membrana mais interna do apicoplasto (van Doore *et al.*, 2008). Entretanto, até o momento não foi descrito a presença de um translocador da membrana externa (TOC) nesta organela.

Por esta organela ser exclusiva dos Apicomplexa e de ter sido demonstrado que alterações nas vias bioquímicas desta organela interferem na replicação do parasito, ela é considerada como possível alvo para quimioterapia da toxoplasmose (Fichera e Roos, 1997; Mazumdar *et al.*, 2006 e Fleige *et al.*, 2007).

vi) Acidocalcissomo

Os acidocalcissomos estão dispersos por todo o citoplasma do parasita e são organelas envolvidas na regulação de cálcio e outros íons e do pH intracelular (Miranda *et al.*, 2008). É o local onde se estoca a maior parte do cálcio intracelular neste parasito (Moreno e Zhong, 1996).

vii) Corpos Lipídicos

Corpos lipídicos são inclusões citoplasmáticas de armazenamento de triacilglicerol e ésteres de esterol, limitadas por uma monocamada de fosfolípido. Estas estruturas observadas no citoplasma são geradas através da aquisição de lipídeos pelo parasito durante sua infecção na célula hospedeira (Charron e Sibley, 2002). A síntese destes corpos lipídicos está relacionada à atividade de enzimas envolvidas na síntese de lipídios de reserva, tais como triacilgliceróis e ésteres de colesterol (Quitnat *et al.*, 2004; Nishikawa *et al.*, 2005).

viii) Micronemas

Os micronemas são pequenas organelas em forma de bastão localizados na extremidade anterior do protozoário. As proteínas endereçadas a esta organela são denominadas MICs e até o momento 11 foram identificadas (revisado em Carruthers e Tomley, 2008). Estas proteínas apresentam vários domínios adesivos, incluindo domínios semelhantes à integrina (MIC2), à trombospondina (MIC 1 e 2), à EGF (fator de crescimento epidermal) (MIC 6, 7, 8 e 9) e às lectinas (MIC3 e MIC 8), que medeiam interações com componentes da superfície da célula hospedeira, proporcionando o deslocamento do parasito, denominado de *gliding* (Carruthers e Tomley, 2008).

ix) Róptrias

Róptrias são organelas em formato de clava, apresentando a região basal (denominada de bulbo) mais larga, com uma matriz com aspecto esponjoso, e uma porção mais afilada, o pescoço, que converge para o interior do conóide (revisto em De Souza *et al.*, 2010). Elas são sintetizadas *de novo* durante a endodiogenia por vesículas oriundas do complexo de Golgi (Nishi *et al.*, 2008; Breinich *et al.*, 2009). Elas são organelas ácidas, apresentando pH entre 5 e 7 na róptria madura, enquanto róptrias em formação, apresentam pH variando entre 3,5 e 5,5 (Shaw *et al.*, 1998). Já foram descritas 29 proteínas no seu interior com localização diferenciada na organela: 24 localizam-se na porção basal, sendo denominadas ROPs; e 5 estão presentes no pescoço, sendo denominadas RONS (revisto em Boothroyd e Dubremetz, 2008).

x) Grânulos Densos

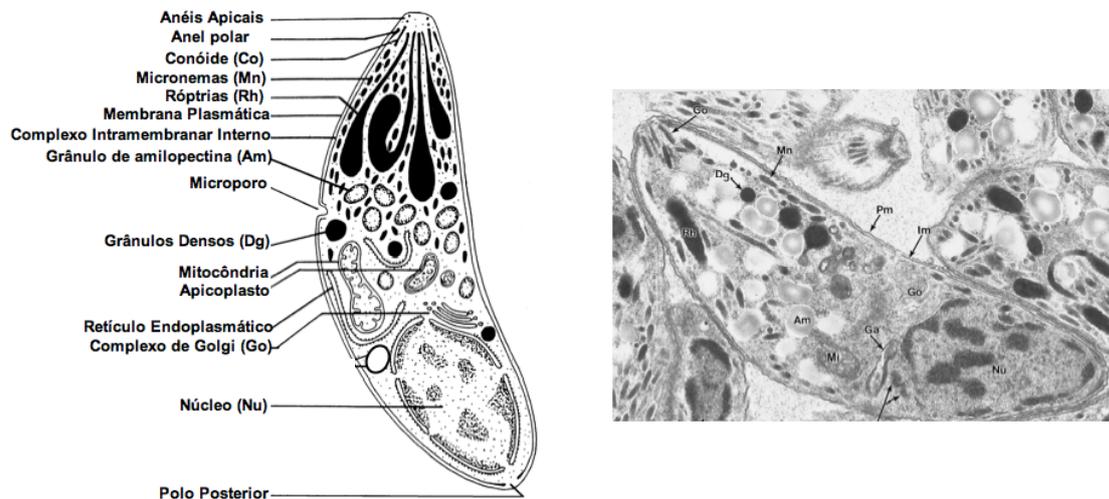
Enquanto micronemas e róptrias se localizam na parte apical do parasito, os grânulos densos, um outro tipo de organela secretória, com forma esférica, de matriz

uniformemente eletrônica densa, encontram-se espalhados por todo o citoplasma (revisto em de Souza *et al.*, 2010). Róptrias e micronemas secretam seu conteúdo pelo pólo apical do parasito, enquanto os grânulos densos secretam pela região lateral e no pólo posterior do corpo do parasito. As proteínas encontradas nesta organela são denominadas de GRAs, localizando-se na membrana do vacúolo parasitóforo (GRAs 3, 5, 7 e 8) e na rede intravacuolar (descrita mais a frente) (GRAs 2, 4 e 6) (Mercier *et al.*, 2005), após a entrada do parasito na célula hospedeira.

4.2 – Forma Bradizoíta

As formas evolutivas encontradas no interior dos cistos teciduais, os bradizoítos, são muito semelhantes aos taquizoítos, porém apresentam algumas peculiaridades (Esquema 5). Eles são um pouco menor que os taquizoítos, medindo cerca de 7 µm por 1,5 µm. O núcleo encontra-se deslocado para a parte posterior do corpo do parasito, as róptrias encontram-se mais eletrônicas e os micronemas em um número maior que o encontrado na forma taquizoíta (Dubey *et al.* 1998; Weiss e Kim, 2000). Até o presente momento, corpos lipídicos ainda não foram observados no citoplasma desta forma.

Grânulos de amilopectina, apesar de serem raramente observados nos taquizoítos, se encontram em grande quantidade no citoplasma dos bradizoítos, distribuídos pelo citoplasma ou agrupados (Coppin *et al.*, 2003). Estes grânulos são ovóides e eletrônicos em preparações convencionais para observação em microscopia eletrônica de transmissão. Apresentam cadeias de glicose com ligações (α 1-4) e natureza bioquímica semelhante ao amido semicristalino de algas vermelhas (Coppin *et al.*, 2005). Acredita-se que sirvam como reserva energética às formas que têm por característica permanecer viáveis por longos períodos, como os bradizoítas e esporozoítas.



Esquema 5 – O desenho à esquerda esquematiza a ultraestrutura do bradizoíto de *T. gondii* observada na micrografia à direita. Adaptado de Dubey *et al.*, 1998.

5 – Diferenças metabólicas e de expressão gênica entre taquizoítos e bradizoítos

Tanto o taquizoíto como o bradizoíto utilizam a via glicolítica como fonte de obtenção de energia. Entretanto, os bradizoítos não apresentam nem a cadeia respiratória ativa nem o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Denton *et al.*, 1996). Há diferenças entre estes estágios evolutivos quanto à atividade de certas enzimas metabólicas, como a lactato desidrogenase (LDH) e a enolase (ENO), sendo esta semelhante à enolase encontrada em plantas (Yang e Parmley, 1995, 1997; Dzierszinski *et al.*, 1999, 2001). A LDH1 e ENO2 só são expressas na forma taquizoíta, enquanto que a LDH2 e a ENO1 são expressas pelo bradizoíta. Estas diferenças de expressão e atividade de enzimas glicolíticas poderiam indicar diferenças metabólicas entre estas formas evolutivas.

Mudanças de expressão gênica também ocorrem neste processo de diferenciação, principalmente de moléculas de superfície. Por exemplo, taquizoítos expressam predominantemente SAG1, SAG2a, SAG3, SRS2, SRS2 e SRS3 na sua superfície. Enquanto que bradizoítos expressam SAG2C, SAG2D, SAG2X, SAG2Y,

SRS9 e SAG4, além de BAG1, usada como marcador da diferenciação taquizoíto-bradizoíto (revisto em Blader e Saeij, 2009).

6 - Infecção da Célula Hospedeira

6.1 - Invasão

O processo de invasão tem início quando há contato entre o taquizoíto e a superfície da célula hospedeira. Nesta primeira etapa, ocorre a ligação de baixa afinidade entre moléculas expostas na superfície celular e proteínas ancoradas por glicosil—fosfatidil-inositol (GPI) presentes na membrana do parasito, como as SAGs (*surface antigens*) e as SRSs (*SAG related-sequence*) e SUSAs (*SAG-unrelated surface antigens*) (revisto em Carruthers e Boothroyd, 2007). Até o momento não há identificação de receptores específicos presentes na superfície celular que se liguem a estas moléculas superficiais do parasito. Uma dessas proteínas, a SAG3, é capaz de se ligar a heparan sulfato e outras glicosaminoglicanas (Carruthers *et al.*, 2000; Bishop *et al.*, 2005). Furtado e colaboradores (1992) observaram que laminina aumenta a adesão de taquizoítos aos macrófagos *in vitro*. Estas observações apontam para um possível papel de receptores de matriz extracelular nos mecanismos de adesão deste parasito à célula hospedeira.

Após esta ligação com a superfície da célula, ocorre uma reorientação do parasito, posicionando-se perpendicularmente à superfície celular através do seu pólo apical (Dubremetz *et al.*, 1998). Aparentemente, o *T. gondii* não tem preferências para se ligar a nenhum subdomínio presente na membrana da célula hospedeira e nem há a transferência de moléculas destes domínios para a membrana do vacúolo parasitóforo que se forma (Charron e Sibley, 2004). Isto provavelmente está ligado ao ciclo de vida do protozoário. Como ele é capaz de infectar diferentes tipos celulares, sem ter

subdomínios para se ligar a uma célula, ele pode utilizar receptores e ligantes comuns a todas as células para se ligar à membrana plasmática.

No momento da adesão do taquizoíta à superfície da célula hospedeira há a secreção das proteínas dos micronemas (Dubremetz *et al.*, 1998). Estas proteínas, denominadas MICs, promovem o ancoramento do *T. gondii* à superfície da célula hospedeira. A porção N-terminal das MICs se conecta aos filamentos de F-actina do parasito através de uma proteína, a aldolase. Estes filamentos estão ancorados ao complexo interno de membranas por uma ligação com uma miosina, a TgMyoA. Esta molécula promove o deslocamento dos filamentos de actina para a parte posterior do parasito, que acaba por deslocar também o complexo MIC-receptor que se encontra ligado a estes filamentos. Este processo permite que o parasito se desloque para frente, promovendo a entrada deste na célula hospedeira (este processo foi revisado em Soldati e colaboradores em 2001 e em Carruthers e Boothroyd em 2007). O tratamento prévio de taquizoítos com citocalasina D impediu invasão destes parasitos nas células hospedeiras, evidenciando a importância da participação da actina do parasita na sua invasão da célula hospedeira (Dobrowolski e Sibley, 1996). Para penetrar na célula hospedeira, o parasito extrude uma estrutura em forma de cone formada por tubulina, o conóide (Morisaki *et al.*, 1995).

Enquanto ocorre a internalização do parasito, há a formação de uma estrutura transitória, a junção móvel (Mordue *et al.*, 1999a). Ela ocorre entre a membrana da célula hospedeira e a membrana do parasito, permitindo que somente proteínas da célula hospedeira sem porção citoplasmática, independentes do tamanho, integrem a membrana do vacúolo parasitóforo que está sendo formado, excluindo proteínas envolvidas na fusão de vesículas da membrana deste vacúolo (Mordue *et al.*, 1999a). Alexander e colaboradores, em 2005, demonstraram que esta estrutura transitória seria

formada por um complexo protéico de diferentes organelas: eles identificaram as proteínas AMA 1 (ancorada por GPI e secretada pelos micronemas) e as RON 2, 4, 5 e 8 (presentes no pescoço das róptrias e secretadas durante a invasão) nesta estrutura. Ao formar esta junção transitória, o parasito sofre uma constrição, deformando o seu corpo (Esquema 6). Ele suportaria esta constrição graças à associação dos microtúbulos subpeliculares, rede subpelicular e o complexo intramembranar, como mencionado anteriormente (revisto em Santos *et al.*, 2009).



Esquema 6 – Representação da penetração ativa do *Toxoplasma gondii*, denotando a constrição do corpo durante a passagem pela junção móvel. Enquanto ele penetra na célula, há a formação de um vacúolo parasitóforo. Retirado de Morrissette e Sibley (2002).

6.2 - Formação do Vacúolo Parasitóforo

Enquanto o parasito invade a célula, ocorre a formação do vacúolo parasitóforo (Esquema 6). Estudos morfológicos e eletrofisiológicos demonstraram que os lipídeos que formam a membrana deste vacúolo são derivados da membrana da célula hospedeira, não tendo contribuição de organelas intracelulares, como o complexo de Golgi, retículo endoplasmático e lisossomos (Suss-Toby *et al.*, 1996). Este vacúolo difere substancialmente das membranas endossomais, não interagindo nem com a via endocítica nem com a via exocítica da célula hospedeira (Mordue *et al.*, 1999b), evitando assim a acidificação ou fusão com lisossomos (Jones e Hirsh, 1972; Sibley *et al.*, 1985).

A membrana deste vacúolo parasitóforo sofre modificações por conteúdos secretados pelas róptrias. Durante a invasão, os conteúdos das róptrias são secretados na

célula hospedeira, através de vesículas que irão posteriormente se fundir com a membrana do vacúolo (Hakansson *et al.*, 2001). Estas vesículas contêm, além de proteínas (as ROPs), estruturas membranares que irão fazer parte da membrana vacuolar (revisto em Ravindran e Boothroyd, 2008). Coppens e Joiner (2003) demonstraram que para que as róprias possam secretar seu conteúdo e formar o vacúolo parasitóforo há a necessidade do colesterol da célula hospedeira. Pacheco-Soares e De Souza (2000) mostraram que proteínas e lipídeos da membrana da célula hospedeira estão presentes não só na membrana do vacúolo parasitóforo, mas também são inseridos na membrana do parasito durante a invasão. Em um trabalho recente (Lemgruber *et al.*, 2008) foi mostrado, por criofratura, que a membrana deste vacúolo parasitóforo mantém a densidade de partículas intramembranares durante a infecção, mesmo com o aumento do volume do vacúolo.

6.3 – Modificações na célula hospedeira

ROP2 é uma proteína transmembranar que expõe sua parte N-terminal no citoplasma da célula hospedeira (Beckers *et al.*, 1994). Esta parte N-terminal apresenta uma seqüência de aminoácidos que se assemelha ao sinal de importação mitocondrial (Sinai e Joiner, 2001). Assim, esta parte da ROP2 é inserida na membrana externa mitocondrial (demonstrado com mitocôndrias *ex vivo*), promovendo a associação membrana do vacúolo parasitóforo-mitocôndria. Esta associação com a mitocôndria, além da ligação com o retículo endoplasmático (por um mecanismo ainda não definido) facilitariam a aquisição de lipídeos pelo parasito (como revisto em Martin *et al.*, 2007).

Halonen e Weidner (1994) mostraram que, em astrócitos *in vitro*, além destas duas organelas, o vacúolo também seria circundado por filamentos intermediários. Estes autores acreditam que este fato facilitaria a localização do vacúolo parasitóforo perto do

núcleo celular, facilitando a interceptação de purinas pelo parasito, já que ele não é capaz de realizar a síntese *de novo* de purinas.

Os grânulos densos são importantes para a manutenção do vacúolo parasitóforo, tendo suas proteínas (GRA) secretadas no vacúolo logo após a invasão e durante a replicação intracelular do parasito (revisto em Mercier *et al.*, 2005). Elas são incorporadas à membrana do vacúolo e a uma rede formada dentro do vacúolo (discutida adiante). Schwab e colaboradores (1994) observaram que moléculas de até 1300 Da teriam livre passagem entre o citoplasma da célula hospedeira e a matriz do vacúolo parasitóforo. Assim, sugeriram que proteínas presentes na membrana do vacúolo parasitóforo estariam associadas umas às outras formando poros permitindo este tráfego de solutos de baixo peso molecular que o parasito poderia usar no seu metabolismo. Coppens e colaboradores (2006) mostraram que a membrana do vacúolo parasitóforo estaria associada com o centro organizador de microtúbulos da célula hospedeira e o vacúolo seria recoberto por microtúbulos da célula hospedeira. Lisossomos da célula hospedeira que trafegam por estes microtúbulos seriam seqüestrados para a matriz vacuolar, otimizando esta captação de metabólitos celulares pelo parasito (Coppens *et al.*, 2006).

6.4 - Rede Intravacuolar

Entre a membrana do vacúolo parasitóforo e a membrana plasmática do *T. gondii*, se forma uma rede tubulovesicular composta de nanotúbulos de 60-90 nm de diâmetro conectando estas duas membranas (Mercier *et al.*, 2002). Estes autores acreditam que ela ajuda no desenvolvimento do parasito, aumentando a área de trocas moleculares entre o parasito e a célula hospedeira. Porém, nosso grupo mostrou que esta rede atuaria como suporte para os taquizoítas dentro do vacúolo parasitóforo, facilitando

o arranjo em forma de roseta observado durante os sucessivos ciclos de endodiogenia (Magno *et al.*, 2005).

Proteínas dos grânulos densos, as GRAs, estão associadas a esta rede (revisito em Mercier *et al.*, 2005). Elas são secretadas pela extremidade posterior do parasito para a matriz vacuolar em formas solúveis, sendo posteriormente incorporadas a esta rede intravacuolar nascente ou à membrana vacuolar (Mercier *et al.*, 2002).

Após a secreção destas proteínas, há a secreção de membranas lamelares pelo parasito no lúmen do vacúolo parasitóforo no pólo posterior do parasito (Sibley *et al.*, 1995; Mercier *et al.*, 2002). As GRAs teriam o papel de dar a conformação e estabilidade a esta rede.

7 – O cisto tecidual

No hospedeiro intermediário, os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos, que permanecem latentes dentro de uma estrutura denominada de cisto tissular (Weiss e Kim, 2007). Estes cistos podem ser formados em diferentes tecidos, sendo encontrados principalmente nos tecidos nervoso e muscular. Os cistos maduros formados apresentam diâmetro entre 50-70 μm , podendo abrigar no seu interior até 1000 bradizoítas (Dubey *et al.*, 1998). O tamanho do cisto depende da idade do cisto, do tipo de célula em que ele se encontra e da cepa de *T. gondii* (Weiss e Kim, 2007). Em culturas primárias de astrócitos, se observou filamentos intermediários envolvendo o cisto, bem como mitocôndrias, como descrito também em células musculares esqueléticas (Lindsay *et al.*, 1993; Halonen *et al.*, 1998; Guimarães *et al.*, 2008).

O cisto tecidual de *T. gondii* é limitado por uma estrutura denominada de parede cística. Esta parede apresenta menos de 500 nm de espessura, sendo composta por material tanto da célula hospedeira quanto do próprio parasito. Esta parede é limitada

por uma membrana com numerosas invaginações e, abaixo desta membrana, acumula-se um material granular, que também preenche o espaço entre os bradizoítos (Ferguson e Hutchison, 1987a, 1987b; Ferguson, 2004). Parmley e colaboradores identificaram uma proteína, denominada de MAG1, nesta matriz do cisto, sem apresentar ainda uma função caracterizada (Parmley *et al.*, 1994). Posteriormente, observou-se que esta proteína também é secretada pelo taquizoíto na matriz do vacúolo parasitóforo (Ferguson e Parmley, 2002). As proteínas GRA 1, 2, 3, 5, 6 e 7 já foram observadas na matriz do cisto por imunohistoquímica, bem como a GRA 5 na membrana limitante da parede cística (Ferguson, 2004). Nenhuma rede tubular foi observada na matriz do cisto tissular (Ferguson e Dubremetz, 2007).

8 - Encistamento *in vitro*

Para melhor estudar as etapas da diferenciação de taquizoíto para bradizoíto e a transformação do vacúolo parasitóforo em cisto tissular, o processo de encistamento *in vivo* foi mimetizado *in vitro*. Matsubayashi e Akao (1963) foram os primeiros a estabelecer um protocolo de diferenciação *in vitro*. O uso de anticorpos que reconhecem antígenos específicos tanto para taquizoítos quanto para bradizoítos, possibilitou o desenvolvimento de novas técnicas de diferenciação assim como facilitou o estudo deste processo (revisto em Weiss e Kim, 2000).

Recentemente, com o desenvolvimento da técnica de marcação de moléculas com GFP (*green fluorescence protein*) foi possível visualizar proteínas específicas de certas estruturas, facilitando o acompanhamento da diferenciação por microscopia óptica (Dzierszinsky *et al.*, 2004). Neste trabalho, os autores observaram que as róptrias não sofrem alteração durante a diferenciação, os micronemas estão mais dispersos, ocorre uma diminuição dos grânulos densos em momentos iniciais, mas voltando a

níveis iguais aos de taquizoítas em momentos mais tardios do encistamento. Interessantemente, ocorrem problemas na segregação do apicoplasto, que pode se localizar no corpo residual ou aparecer em cópia dupla em alguns bradizoítos e mesmo ausentes em outros.

Foi observado que há certa porcentagem de parasitos que se diferenciam espontaneamente em culturas de células, sem a necessidade de indução (revisto em Weiss e Kim, 2000, 2007). Cepas que apresentam uma taxa de replicação mais lenta (como a Me49 e Pru) são mais cistogênicas, tornado o seu uso para a formação *in vitro* de cistos mais aconselhável que cepas de replicação rápida (como a RH) (Weiss e Kim, 2000). Esta facilidade de diferenciação é perdida com prolongada passagem em cultura, com os parasitos desenvolvendo uma taxa de replicação mais rápida (revisto em Weiss e Kim, 2000).

Os protocolos de encistamento *in vitro* utilizam condições de estresse para induzir este processo. Estas condições estressantes são: alta temperatura (em torno de 43 °C), pH ácido (6.6 – 6.8) ou básico (8 – 8.2) e estresse químico (promovido pelo arsenato de sódio) (Soete *et al.*, 1994; Weiss *et al.*, 1995; Soete e Dubremetz, 1996). Citocinas também já foram utilizadas como indutores do processo de diferenciação, como IFN- γ (Bohne *et al.*, 1994). Esta diferenciação estaria relacionada com a produção de óxido nítrico induzida pela citocina, uma vez que o uso da substância NMMA (N^G-monometil-L-arginina, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase) inibiu a diferenciação (Bohne *et al.*, 1994). A diferenciação para bradizoítas é aumentada também com o uso de nitroprusseto de sódio (doador exógeno de óxido nítrico), além da oligomicina (inibidor da função ATP sintase mitocondrial) e da antimicina A (inibidor do transporte de elétrons na cadeia respiratória) (Bohne *et al.*, 1994; Tomavo e Boothroyd, 1995; Weiss *et al.*, 1996;). Estes agentes mencionados também atuam na

célula hospedeira e, portanto, não se pode descartar uma possível participação da célula hospedeira nessa diferenciação. Entretanto, Weiss e colaboradores (1998) sugeriram que a diferenciação não sofreria influência da célula hospedeira, uma vez que prévia exposição de taquizoítas a pH básico já seria suficiente para induzir o encistamento.

Os marcadores de bradizoítas (antígenos tanto de superfície quanto de parede) são observados 24 horas após a indução do processo de diferenciação, indicando um possível comprometimento com a diferenciação logo após a entrada do parasito na célula hospedeira (revisto em Weiss e Kim, 2000). Estruturas típicas (como a parede cística) são observadas no microscópio eletrônico de transmissão 6 dias após a indução da diferenciação.

Recentemente, o grupo da Dra. Helene Barbosa na Fiocruz (Rio de Janeiro) mostrou que em culturas primárias de células musculares não há a necessidade de uso de agentes estressantes para a indução do encistamento, ocorrendo um encistamento espontâneo na cultura (Guimarães *et al.*, 2008, 2009; Ferreira-da-Silva *et al.*, 2008, 2009a e 2009b).

9 – Justificativa do projeto

O encistamento é fundamental no ciclo de vida do *T. gondii*, pois permite o escape ao sistema imunológico do hospedeiro, restringindo a comunicação com a célula hospedeira e conseqüente diminuição na apresentação de antígenos, favorecendo a persistência deste protozoário no organismo (Weiss e Kim, 2000). Os bradizoítos encontram-se protegidos dentro dos cistos por uma barreira física formada durante o encistamento, a parede cística, que poderia dificultar o acesso de fármacos atualmente usados na quimioterapia da toxoplasmose aos bradizoítos. A caracterização das modificações ocorridas durante a diferenciação do vacúolo parasitóforo durante a

formação do cisto tecidual bem como as alterações sofridas pelo próprio parasito são fundamentais para um melhor entendimento da patogenia da toxoplasmose, além de abrir novas possibilidades de alvos quimioterápicos.

É interessante a observação de um processo onde um vacúolo contendo algumas unidades de parasitos se diferencia em uma estrutura morfológicamente distinta contendo centenas de parasitos. Acompanhar o processo de encistamento e observando as modificações que ocorrem na membrana do vacúolo parasitóforo nos possibilitará saber como ocorre a formação da parede cística, além de permitir a caracterização do arranjo dos componentes desta estrutura. Também nos possibilitará caracterizar as alterações pelas quais passa o parasito durante a diferenciação de uma forma em outra.

A observação do encistamento possibilitará caracterizar a matriz do cisto, elucidando que estruturas poderiam estar ali presentes e como seriam secretadas pelos bradizoítas. A organização interna da estrutura cística pode ser observada com o uso da técnica de feixe de íons concentrados para desbastar o cisto tecidual.

Não só as alterações morfológicas sofridas pelo parasito são interessantes como também aquelas que as quais a célula hospedeira sofre para comportar agora uma estrutura bem maior em seu citoplasma. É importante saber se a ligação com as mitocôndrias da célula hospedeira permanece na fase crônica bem como a aproximação com o retículo endoplasmático e outras organelas ou elementos do citoesqueleto são mantidos após a diferenciação e formação do cisto.

Boothroyd e colaboradores em 1997 utilizaram a lectina WGA (*wheat germ agglutinin*), que se liga a resíduos de N-acetil-glicosamina, observaram que esta lectina reconhecia componentes da parede cística. A quitina é um polímero de N-acetil-glicosamina e este polímero é um componente importante de outros parasitos que apresentam parede, como ameba e fungos. Estes autores trataram o cisto com quitinases

e houve a perda da marcação da lectina WGA, sugerindo a presença de quitina na parede cística de *T. gondii*. Posteriormente, Zhang e colaboradores (2001) caracterizaram uma glicoproteína denominada CST1, reconhecida pela lectina de *Dolichos biflorus* (DBA), que evidencia resíduos de N-acetil-galactosamina. Estes dados denotam a complexidade da parede cística, sugerindo que ela seja formada por diferentes componentes. Quitinases são enzimas importantes para vários patógenos, como *Leishmania sp.* e *Plasmodium sp.*, sendo, portanto, importantes alvos para desenvolvimento de novos fármacos (Shahabuddin e Kaslow, 1993). Uma caracterização desta enzima bem como da enzima quitina sintase em *T. gondii* poderá possibilitar formulação de drogas que possam ter atividade na fase crônica da infecção.

As rôptrias são organelas cujo conteúdo pode ser secretado e inserido na membrana da célula hospedeira formando a junção móvel, ou ser secretado no citoplasma da célula hospedeira, se localizando posteriormente no núcleo da célula hospedeira, na membrana do vacúolo parasitóforo ou no lúmen desta estrutura (revisado em Boothroyd e Dubremetz, 2008). Estas diferentes funções e localizações destas proteínas, tanto durante a invasão, mas na própria organela, sugerem que ela possa apresentar diferentes domínios nesta organela. Os taquizoítas utilizam o conteúdo desta organela para modificar o vacúolo parasitóforo. Poderia o bradizoíta também utilizar esta via de secreção para também modificar o seu ambiente, no cisto tecidual?

Objetivo

- **Geral**

- Caracterizar o cisto e o processo de encistamento de *Toxoplasma gondii*.

- **Objetivos Específicos**

- Caracterizar a ultraestrutura de cistos teciduais de *T. gondii* isolados de cérebros de camundongo, analisando: i) a secreção de vesículas pelos bradizoítas; ii) os elementos da matriz cística; iii) a organização dos elementos da parede cística;
- Analisar a natureza molecular e química dos elementos do cisto tecidual de *T. gondii* isolado;
- Determinar se *T. gondii* apresenta genes para quitinase e quitina sintase em seu genoma;
- Analisar comparativamente o pólo apical de bradizoítos e de taquizoítos congelados e fraturados, dando ênfase às rôptrias;
- Estabelecer o protocolo de encistamento *in vitro* de *T. gondii* em linhagens epiteliais e de fibroblasto, caracterizando os cistos formados;
- Comparar as estruturas celulares das formas taquizoítas com as bradizoítas de *T. gondii* através da morfometria de cortes ultrafinos.

Material e Método

1 - Manutenção dos parasitos

1.1 – Cepa Me49

Cistos da cepa cistogênica Me49 de *Toxoplasma gondii* foram mantidos em camundongos com 1 a 3 meses de infecção através da inoculação intraperitoneal de 80 cistos teciduais isolados do cérebro de camundongos CF1 infectados.

Taquizoítos da cepa Me49 de *T. gondii* foram obtidos através de lavagem intraperitoneal 5 dias após a inoculação de 100 cistos nos camundongos. E em seguida, a fim de eliminar restos celulares e células peritoneais residentes, o material foi centrifugado por 5 minutos a 200 x g. O sobrenadante contendo os taquizoítos foi transferido para um outro tubo cônico e centrifugado a 1000 x g por 10 minutos. O *pellet* contendo os parasitos foi, então, ressuspenso em solução salina.

1.2 – Cepa RH

Taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* foram mantidos através de sucessivas passagens intraperitoneais em camundongos CF1. Animais adultos foram inoculados com 2×10^6 parasitos e, após 48 horas, foram sacrificados em câmara de CO₂. Os parasitos foram recolhidos através de lavagens peritoneais com solução salina (PBS pH 7,0) e, a fim de eliminar restos celulares e células peritoneais residentes, o material foi centrifugado por 5 minutos a 200 x g. O sobrenadante contendo os taquizoítos foi transferido para outro tubo de ensaio e novamente centrifugado a 1000 x g por 10 minutos. O *pellet* contendo os parasitos foi, então, ressuspenso em solução salina e inoculado em novos camundongos.

1.3 - Cepa EGS

A cepa EGS, isolada e cedida pelo Dr. Ricardo Vitor da UFMG (Ferreira *et al.*, 2001), foi mantida através da infecção oral (gavagem) a partir de cistos teciduais obtidos de camundongos CF1 em fase crônica por 2 meses. Camundongos infectados com 5 – 10 cistos, após 4 dias de infecção, foram tratados com 1mg/mL de sulfadiazina, adicionado à água da mamadeira por um período mínimo de 10 dias, para indução da fase crônica da infecção.

Taquizoítos da cepa EGS foram obtidos através de lavagem peritoneal 4-5 dias após a infecção dos camundongos, infectados com 200 cistos. E em seguida, a fim de eliminar restos celulares e células peritoneais residentes, o material foi centrifugado por 5 minutos a 200 x g. O sobrenadante contendo os taquizoítos foi transferido para um outro tubo falcon e centrifugado a 1000 x g por 10 minutos. O *pellet* contendo os parasitos foi, então, ressuspenso em solução salina.

2 - Cultivo e manutenção da célula hospedeira

2.1 – Linhagem Epitelial

A linhagem celular epitelial de rim de macaco Rhesus, LLC-MK2 (Kidney, Rhesus monkey, *Macaca mulatta*) foi utilizada para experimentos de encistamento *in vitro* com taquizoítos da cepa Me49 e EGS. As células foram mantidas em garrafas plásticas de 25cm² (TPP) contendo meio RPMI e 5% de soro fetal bovino em uma estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Após a formação de monocamadas confluentes, o meio foi retirado e 1mL de Tripsina-Verseno adicionado para romper as ligações entre as células e destacá-las da garrafa. Um minuto depois, a tripsina foi retirada e as células desprendidas da superfície com jatos de meio RPMI. A manutenção das culturas foi feita pelo inóculo de novas garrafas.

2.2 – Fibroblasto

Fibroblasto de pele humana (HFSF), doados pelo Prof. Renato DaMatta (UENF), foi utilizado para experimentos de encistamento *in vitro* com taquizoítos da cepa Me49 e EGS. As células foram mantidas em garrafas plásticas de 25cm² (TPP) contendo meio RPMI suplementado com 2mM de glutamina e 5% de soro fetal bovino em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Após a formação de monocamadas confluentes, o meio foi retirado e 1mL de Tripsina-Verseno adicionado para romper as ligações entre as células e liberá-las da garrafa. Um minuto depois, a tripsina é retirada da garrafa e as células desprendidas da superfície com jatos de meio RPMI. A manutenção das culturas foi feita pelo inóculo de novas garrafas.

3 – Isolamento dos cistos de *Toxoplasma gondii*

Para isolar cistos teciduais de *T. gondii* o protocolo estabelecido por Freyre (1995) foi adaptado. Cérebros de camundongos na fase crônica da infecção por pelo menos 4 semanas foram retirados e lavados em solução balanceada de Hanks (HBSS) gelada para remoção de células sanguíneas. Sendo, em seguida, fragmentados com o auxílio de uma tesoura e solubilizados através de sucessivas passagens em agulhas de 18 a 23 G de calibre. A suspensão, então, foi transferida para um tubo cônico e centrifugada a 1000 g por 10 minutos. O *pellet* obtido foi ressuspenso em uma solução de 25% de Dextran (Sigma) em HBSS e centrifugado a 2200 g por 10 minutos. Os cistos do *pellet* foram lavados com HBSS para retirada do Dextran.

4 – Permeabilidade da parede cística

Para determinar se a parede cística seria permeável a pequenos solutos, incubamos cistos de Me49 isolados de cérebros de camundongos na fase crônica da

infecção com o traçador Lucifer yellow (Sigma, EUA), de 457 Da de peso molecular, por 20 minutos a temperatura ambiente. Após este tempo, observamos o material no microscópio óptico Zeiss Axioplan.

5 – Estabelecimento do processo de encistamento *in vitro*

5.1 – Linhagem Epitelial

Células LLC-MK₂ foram mantidas em uma estufa a 42°C por 1 hora e, em seguida, recolocadas a 37°C. Posteriormente, as culturas foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* da cepa Me49 ou EGS por 2 horas e, após este tempo lavadas com meio para a retirada dos parasitos extracelulares. O estímulo para o processo de encistamento foi feito através de choque térmico: as culturas foram postas a 42° C por 1 hora e trinta minutos (adaptado de Soête *et al.*, 1994). A diferenciação foi confirmada através de imunofluorescência das culturas utilizando a lectina de *Dolichos biflorus* (DBA) ligada a FITC (Sigma, EUA), que reconhece resíduos de N-acetil-galactosamina, presentes nos elementos que formam a parede cística (Zhang *et al.*, 2001).

5.2 – Fibroblasto

Fibroblastos foram postos para interagir com taquizoítos de *T. gondii* da cepa EGS. O meio não foi trocado durante a interação. Após 4-5 dias acompanhando a cultura ao microscópio invertido, cistos intracelulares foram observados na cultura. A diferenciação foi confirmada através de imunofluorescência das culturas utilizando a lectina de *Dolichos biflorus* (DBA) ligada a FITC (Sigma, EUA), que reconhece resíduos de N-acetil-galactosamina, presentes nos elementos que formam a parede cística (Zhang *et al.*, 2001).

6 – Microscopia de Fluorescência

Cistos teciduais da cepa Me49 de *T. gondii* foram isolados de camundongos após um a três meses de infecção e fixados por 12 horas em uma solução contendo 4% de formaldeído nascente em solução salina, pH 7,2. O material foi, então, lavado no mesmo tampão e posto para aderir em lamínulas de vidro cobertas com poli-L-lisina a 1mg/mL (Sigma, EUA) por 1 hora. Em seguida, o material foi lavado com a mesma solução salina e incubados com o tampão de bloqueio (3% de albumina bovina em solução salina, pH 8,0) por 1 hora e trinta minutos. Após este tempo, o material foi incubado com o marcador Calcofluor white (Sigma, EUA), que reconhece quitina e celulose, a 5 µg/mL por 30 minutos. Posteriormente, o material foi lavado com tampão de bloqueio, montado em lâminas de vidro com N-propil-galato e selado com esmalte. O material foi então observado no microscópio Zeiss Axioplan.

7 - Microscopia Eletrônica de Varredura

i) Convencional

Cistos teciduais da cepa Me49 de *T. gondii* foram isolados de camundongos após um a três meses de infecção e fixados por 24 horas em solução contendo 4% de formaldeído nascente e 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. O material foi lavado no mesmo tampão e, em seguida, pós-fixado por 1 hora em uma solução contendo 1% de OsO₄, 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5 mM de cloreto de cálcio diluídos em 0,1M de tampão cacodilato de sódio. Após este período, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (de 30 a 100%), por 20 minutos em cada etapa e seco pelo método do ponto crítico por CO₂, metalizado com uma cobertura de ouro de 15 nm em um aparelho Balzers Union FL9496 e observado no

microscópio eletrônico de varredura JEOL 5310, com uma distância de trabalho de 11 mm e operando a 20 kV.

Para observação do cisto de *T. gondii* nos cérebros de camundongos na fase crônica da infecção com a cepa Me49, estes cérebros foram removidos e fixados *overnight* em solução contendo 0,1% de glutaraldeído e 2% de formaldeído nascente diluídos em 0,1M de tampão cacodilato de sódio. Em seguida, o material foi infiltrado com 25% e em 50% de dimetilsulfóxido (DMSO), por 1 hora em cada etapa, embrulhado em parafilme, congelado por imersão no nitrogênio líquido e fraturado com o uso de uma navalha congelada. Os fragmentos obtidos foram lavados em água destilada e processados como descrito anteriormente para a microscopia eletrônica de varredura. O material fraturado foi observado no microscópio eletrônico Zeiss EVO 40 do Jardim Botânico – Rio de Janeiro, com uma distância de trabalho de 9 mm e operando a 16 kV.

ii) De Emissão de Campo

Cistos teciduais da cepa Me49 foram isolados de camundongos após um a três meses de infecção e fixados por 24 horas em solução contendo 4% de formaldeído nascente e 2,5% de glutaraldeído em 0,1M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2 e lavados no mesmo tampão. Em seguida, foram pós-fixados por 1 hora em uma solução contendo 1% de OsO₄, 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5 mM de cloreto de cálcio diluídos em 0,1m de tampão cacodilato de sódio. Após este período, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (de 30 a 100%), por 20 minutos em cada etapa e seco pelo método do ponto crítico por CO₂, metalizado com uma fina camada de cromo de 5 nm no aparelho high Vacuum Sputter Coater SCD 500 (Bal-Tec)

e observado ao microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo JEOL 6340F com uma distância de trabalho de 8 mm e operado a 5kV.

8 – Desbastamento com feixe de íons concentrado (FIB)

Cistos teciduais da cepa Me49 foram isolados de camundongos com um a três meses de infecção e processados para microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo como descrito anteriormente. O material montado em suporte foi coberto com uma camada fina de cromo (Balzers) e transferido para o aparelho FEI Nova NanoLab6 DualBeam™ (FEI Company, Holanda). No modo *cut-and-view* a amostra foi girada a 52°, mantendo-se o feixe de íons gálio concentrado perpendicular à superfície do material. A superfície do cisto tecidual de *T. gondii* foi desbastada com uma voltagem de 30 kV e corrente entre 1 e 7 nA. Imagens do interior do cisto foram obtidas usando o modo de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM). Este procedimento foi realizado no Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial (INMETRO) – Rio de Janeiro.

9 - Microscopia Eletrônica de Transmissão

A - Fixação convencional

Cistos teciduais da cepa Me49 foram isolados de camundongos após um a três meses de infecção e fixados por 24 horas em uma solução contendo 4% de formaldeído nascente e 2,5% de glutaraldeído em 0,1M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2. O material foi lavado no mesmo tampão e, em seguida, pós-fixado por 1 hora e meia em uma solução contendo 1% de OsO₄, 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5 mM de cloreto de cálcio diluídos em 0,1M de tampão cacodilato de sódio. Após este período, o material foi lavado no mesmo tampão, desidratados em concentrações crescentes de

acetona (de 30 a 100%), por um período de 20 minutos em cada etapa, e infiltrado com soluções crescentes de acetona-resina Polybed 812 (2:1, 1:1 e 1:2) por um período de 24 horas em cada etapa, sendo em seguida incluídos em resina pura. Cortes ultrafinos foram obtidos utilizando o ultramicrotomo Reichert e coletados em grades de cobre. Os cortes foram contrastados com 5% acetato de uranila e citrato de chumbo, e posteriormente observados no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900 ou Jeol 1200.

B – Citoquímica de carboidratos

Para a detecção de carboidratos utilizamos a técnica de Thiéry (1967). Cistos teciduais da cepa Me49 foram isolados de camundongos após um a três meses de infecção e fixados por 24 horas em uma solução contendo 4% de formaldeído nascente e 2,5% de glutaraldeído em 0,1M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2. O material foi lavado na mesma solução tampão e em seguida, pós-fixado por 1 hora e meia em uma solução contendo 1% de OsO₄, 0,8% de ferrocianeto de potássio e 5 mM de cloreto de cálcio diluídos em 0,1M de tampão cacodilato de sódio. O material foi lavado no mesmo tampão e desidratado em concentrações crescentes de 30 a 100% de acetona, por um período de 20 minutos em cada etapa, e, posteriormente, infiltrado com soluções crescentes de acetona-resina Polybed 812 (2:1, 1:1 e 1:2) por um período de 24 horas em cada etapa, sendo, em seguida, incluído na mesma resina. Cortes ultrafinos foram obtidos utilizando o ultramicrotomo Reichert e coletados em grades de ouro. Estes cortes foram lavados em 1% de ácido periódico por 30 minutos, seguido por duas lavagens rápidas e duas de 10 minutos em água. Posteriormente, foram incubados em 1% de tiosemicarbazida diluída em 10% de ácido acético por 24 horas, para evidenciar glicoconjugados. Após este período, os cortes foram lavados em 10%, 5% e 2% de

ácido acético por 5 minutos em cada diluição, seguido por três lavagens em água destilada. Em seguida, os cortes foram incubados em 1% de proteínato de prata por 30 minutos (no escuro), lavados em água destilada e observados no microscópio eletrônico de transmissão. Como controle negativo da citoquímica, algumas grades não foram incubadas com a tiosemicarbazida.

C – Citoquímica de lipídeos

Cistos teciduais da cepa Me49 foram isolados de camundongos após um a três meses de infecção e fixados *overnight* em solução contendo 2,5% de glutaraldeído e 3% de sacarose em 0,1M de tampão fosfato. Em seguida, o material foi lavado em 0,1 M de tampão fosfato com 7,5% de sacarose e depois, em 0,1M de tampão imidazol, pH 7,5. Posteriormente, o material foi pós-fixado por 2 horas em uma solução contendo 2% de tetróxido de ósmio em 0,1M de tampão imidazol, seguido por uma lavagem em 0,1M de tampão imidazol. O material foi, então, desidratado em concentrações crescentes de 30 a 100% de etanol, por um período de 20 minutos em cada etapa, e infiltrado com soluções crescentes de acetona-resina Polybed 812 (2:1, 1:1 e 1:2) por um período de 24 horas em cada etapa e, em seguida, incluído em resina pura. Cortes ultrafinos foram obtidos utilizando o ultramicrotomo Reichert e coletados em grades de cobre e, posteriormente, observados no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900 ou Jeol 1200.

D – Imunocitoquímica

i) Em cortes de resina

Cistos teciduais da cepa Me49 de *T. gondii* isolados foram fixados por 24 horas na geladeira em solução contendo 4% de formaldeído nascente, 0,2% de glutaraldeído,

0,2% de ácido pícrico, 3% de sacarose e 5 mM de cloreto de cálcio em 0,1M de tampão cacodilato de sódio. Em seguida, o material foi lavado em solução salina PBS, pH 7,2 a 4 °C, desidratado em concentrações crescentes de 30 e 50 % de etanol na geladeira e de 70 a 100% de etanol no freezer, por um período de 30 minutos em cada etapa. Posteriormente, o material foi infiltrado no freezer com soluções crescentes de etanol-resina acrílica hidrofílica Unicryl (2:1, 1:1 e 1:2) por um período de 48 horas em cada etapa e, em seguida, incluído em resina pura. A polimerização foi feita a sob luz ultravioleta a 0 °C. Cortes ultrafinos foram obtidos utilizando o ultramicrotomo Reichert e coletados em grades de níquel. Os cortes foram incubados com uma solução de 50 mM de cloreto de amônio por 30 minutos e por 1 hora no tampão de bloqueio (3% de albumina bovina e 0.02% de Tween em PBS, pH 8,0). Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-GRA3 produzido em camundongo (cedido pelo Dr. Jean-François Dubremetz, Université de Montpellier, França) ou anti-GRA7 produzido em coelho (cedido pelo Dr. John Boothroyd, Stanford University School of Medicine, E.U.A.) diluídos 1:100 em tampão de bloqueio por 1 hora. Após este tempo, as grades foram lavadas com o tampão de bloqueio e, posteriormente, incubadas com o anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 15 nm (anti-camundongo – GRA3) e com o anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal 10 nm (anti-coelho – GRA7) ambos diluídos 1:100 em tampão de bloqueio por 1 hora (BBInternational). Após esse período, as grades foram lavadas com tampão de bloqueio, PBS pH 8,0 e em água destilada, seguidamente. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e posteriormente observados no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900 ou Jeol 1200.

ii) Em Crio-cortes

Cistos teciduais da cepa Me49 foram isolados de camundongos infectados após três meses e fixados *overnight* com uma solução contendo 4% de formaldeído nascente e 0,2% de glutaraldeído diluídos em 0,1M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2. O material foi então infiltrado em solução contendo 25% de polivinilpirrolidona e 2,1 M de sacarose e congelado por imersão em nitrogênio líquido. Crio-cortes foram obtidos cortando o material a -90 °C no crio-ultramicrotomo Ultracut (Reichert). Estes crio-cortes foram incubados em 50 mM de cloreto de amônia por 30 minutos e depois no tampão de bloqueio (3% de albumina bovina em PBS, pH 8,0) por 1 hora. Após esse período, os crio-cortes foram incubados com o anticorpo monoclonal Tg17-43 (que reconhece GRA1, cedido pela Dr. Corinne Mercier, Université Joseph Fourier, França) na diluição de 1:500 em tampão de bloqueio por 1 hora. As grades com os crio-cortes foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal de 10 nm (BBInternational) por 1 hora na diluição de 1:100, em tampão de bloqueio, e posteriormente observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900 ou Jeol 1200. Como controle negativo, omitimos a incubação com o anticorpo primário.

E - Avaliação de espessura e diâmetro da parede e demais elementos dos cistos isolados

Cortes ultrafinos foram utilizados para determinação da espessura da parede e elementos do cisto. Imagens aleatórias (n=20) de cortes ultrafinos de diferentes cistos entre 1 e 3 meses da cepa Me49 foram adquiridas por uma câmera digital MegaView III (Soft Imaging System) e as medições realizadas com o programa iTEM (Soft Imaging System). Esta mesma metodologia foi usada nas imagens obtidas de réplicas de crio-fratura e de crio-fratura seguida de etching.

10 – Morfometria

Cortes ultrafinos foram utilizados para determinação da variação de forma, volume e redistribuição de organelas durante a diferenciação de taquizoíto para bradizoíto. Imagens aleatórias (n=100) de cortes ultrafinos de diferentes bradizoítos e de taquizoítos da cepa Me49 foram adquiridas no mesmo aumento por uma câmera digital MegaView III (Soft Imaging System) e as medições realizadas com o programa iTEM (Soft Imaging System).

11 - Criofratura

i) Convencional

Para criopreservação, taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* isolados foram fixados como descrito anteriormente para Microscopia Eletrônica de Transmissão por fixação convencional. Em seguida, foram infiltrados com concentrações crescentes de glicerol no mesmo tampão até chegar a concentração final de 15%, permanecendo nesta concentração *overnight*. O material foi incubado em glicerol 30% por 3 horas antes de ser congelado por imersão em Freon 22 resfriado em nitrogênio líquido e, em seguida, transferido para nitrogênio líquido. O material foi inserido e posteriormente fraturado a -170°C , seguido de metalização da superfície fraturada com platina (45° de inclinação) e com carbono (90° de inclinação) em um aparelho Balzers BAF 060. As réplicas metálicas foram incubadas em uma solução de hipoclorito de sódio para digestão de todo o material biológico presente sob a réplica, lavadas em água e recolhidas em grades de níquel para observação no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 ou Zeiss 900. Parte deste procedimento foi realizado no laboratório do Prof. Elliot Kitajima, da ESALQ-USP em São Paulo.

Para interpretação das réplicas obtidas, foi necessário que determinar qual das faces da bicapa lipídica está sendo observada. A face da bicapa em contato com o meio extracelular é denominada de face E, ou face extracelular. A face em contato com o meio intracelular, ou citoplasma da célula, é denominada de face P. Entretanto, em organelas intracelulares, o interior destas estruturas é considerado meio extracelular, e o seu exterior, o citoplasma da célula (Branton *et al.*, 1975). Assim, a face convexa representa a face P e a face E da membrana plasmática e da membrana das organelas, respectivamente.

ii) Localização de colesterol em preparação de criofratura

Para determinar a localização de colesterol na membrana da rópria de *T. gondii*, utilizamos o antibiótico poliênico Filipina. Este antibiótico se liga às moléculas de colesterol formando complexos de fácil observação nas réplicas metálicas de material criofraturado. Para tanto, taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* foram fixados como descrito na seção anterior junto com este antibiótico na concentração de 100 µg/mL por 2 horas. Após este período, o material foi processado como anteriormente descrito para criofratura convencional.

12 - Congelamento rápido seguido de criofratura e *etching* profundo

Um concentrado de cistos teciduais da cepa Me49 isolados ou taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foi montado em cima de pedaços de pulmão de coelho fixado e posteriormente congelado rapidamente por impacto, em suporte de cobre resfriado em Hélio líquido. O material congelado foi, então, colocado em um aparelho Balzers BAF 301, fraturado a -115° C e realizou-se o *etching*, que consiste no aumento da temperatura para -100° C por 8 minutos, sublimando o gelo, expondo o interior da

célula, anteriormente imerso no gelo. Em seguida, réplicas metálicas das superfícies fraturadas foram feitas através da evaporação de platina (24° de inclinação) e carbono (90° de inclinação) em mesa rotatória. Estas réplicas foram incubadas em hipoclorito de sódio para digestão de todo o material biológico presente, lavadas em água destilada e recolhidas em grades de cobre de 100 mesh cobertas com Formvar para observação no microscópio eletrônico de transmissão. As micrografias obtidas foram revertidas, fazendo com que os depósitos de platina apareçam em branco e o fundo em preto, obtendo-se assim uma melhor visualização tridimensional do material (Heuser, 1981).

Este procedimento foi realizado sob orientação do prof. Pietro Lupetti no Laboratório de Criotécnicas do Departamento de Biologia Evolutiva, na Universidade de Siena, Itália.

13 – Pesquisa de seqüências gênicas e alinhamento gênico

Com as seqüências da proteína quitinase e da quitina sintase de *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba invadens* (isoformas 1, 2 e 3), *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium berghei* e *Plasmodium gallinaceum* procuramos por seqüências homólogas no genoma seqüenciado do *T. gondii* (<http://www.toxodb.org>). A obtenção de alguma seqüência neste procedimento, permitirá o seu alinhamento com as seqüências conhecidas dos organismos mencionados e a similaridade estabelecida com o programa da página do Projeto genoma do *T. gondii*.

Resultados

Os estudos desta tese iniciaram-se com: (i) seguindo-se pela caracterização ultraestrutural destes cistos; (ii) a determinação da diferença morfológica e estrutural de organelas entre taquizoíto e bradizoíto, dando maior ênfase às róptrias, (iii) o estabelecimento do processo de encistamento *in vitro* em culturas de células epiteliais e fibroblasto, e (iv) pela procura dos genes de quitinase e quitina sintase.

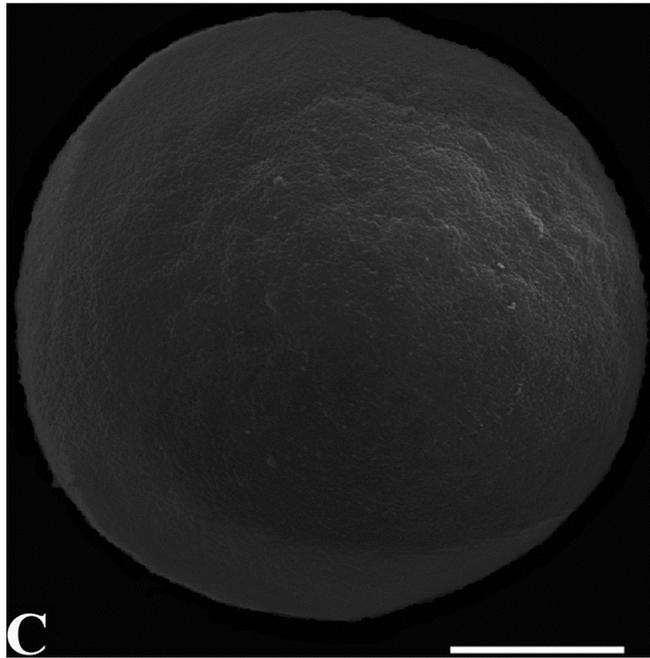
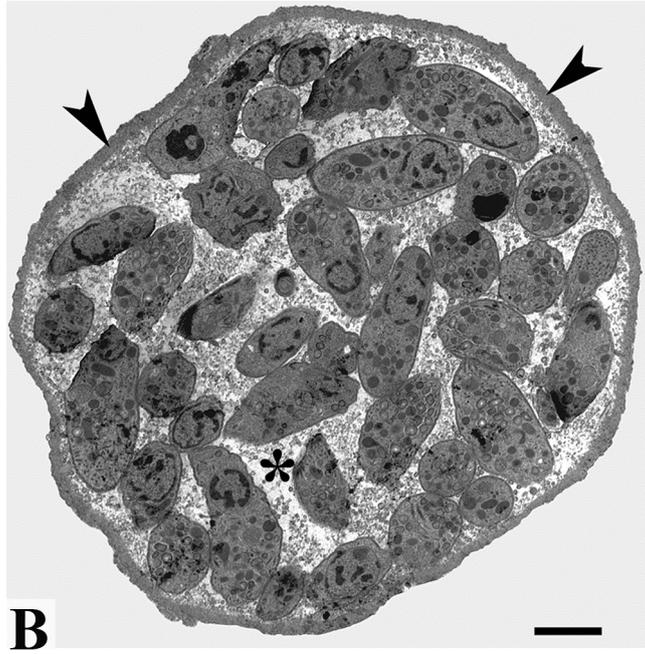
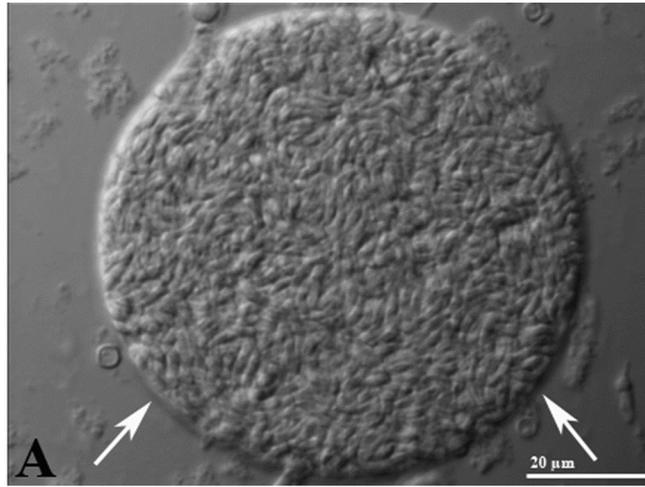
1 – Caracterização da ultraestrutura do cisto

Para caracterização da ultraestrutura do cisto, mais especificamente sua parede cística e a matriz, utilizamos cistos teciduais da cepa Me49 isolados de cérebros de camundongos na fase crônica da infecção.

1.1 – Visão geral

Os cistos da cepa cistogênica Me49 isolados de cérebro de camundongos na fase crônica da infecção apresentaram diâmetro entre 20 a 70 μm , mostrando uma forma esférica tanto quando observados por microscopia óptica (Figura 1A), por microscopia eletrônica de transmissão em cortes ultrafinos (Figura 1B) e por microscopia eletrônica de varredura (Figura 1C). O cisto apresentou uma estrutura densa e espessa – a parede cística (Figura 1B). Cada cisto continha vários bradizoítos no seu interior, posicionados randomicamente na matriz, que era preenchida com um material eletron denso.

Figura 1 - Visão geral do cisto da cepa Me49 de *Toxoplasma gondii* isolado de cérebros de camundongos na fase crônica da infecção. **A** – Cisto da cepa Me49 observado ao final do processo de isolamento. Pode-se notar os bradizoítos no seu interior, bem como a parede cística birrefringente (setas). **B** – Corte ultrafino de um cisto tecidual da cepa Me49 isolado. Diversos bradizoítas encontram-se na matriz do cisto. Esta matriz era preenchida por um material eletrondenso (asterisco). Podemos observar uma estrutura densa e espessa, eletrondensa - a parede cística (cabeças de seta). **C** – Micrografia eletrônica de um cisto da cepa Me49 isolado observado por microscopia eletrônica de varredura, apresentando forma esférica e uma superfície irregular. Barras = 10 µm.



1.2 – A parede cística

Por microscopia eletrônica de varredura convencional e por emissão de campo, a parede mostrou-se com um aspecto irregular, como mostrado na Figuras 2A e B. Estruturas semelhantes a poros, com diâmetro médio de 175 nm, foram observadas na sua superfície. Para termos certeza que estas estruturas não eram artefatos do processo de isolamento dos cistos, adaptamos o protocolo de Tanaka e Mitsushima (1984) a fim de observarmos cistos em cérebros de camundongos na fase crônica da infecção. Os cérebros foram processados como descrito na seção Material e Método, expondo os cistos à observação por microscopia eletrônica de varredura. Estas mesmas estruturas foram observadas na parede de cistos observados em fragmentos de cérebro na fase crônica da infecção com a cepa Me49 que foram congelados e fraturados a baixa temperatura (Figura 2C).

Em cortes ultrafinos observamos que em um mesmo cisto esta parede apresentou-se mais fina em algumas regiões (50 nm de espessura) e, em outras, mais espessa (500 nm de espessura), com uma espessura média de 241,51 nm (Tabela 1). Esta variação foi observada tanto em cistos jovens quanto em maduros, obtidos de camundongos após 1 a 3 meses de infecção.

Pela análise detalhada de cortes da parede cística por microscopia eletrônica de transmissão observamos que esta estrutura é composta de uma unidade de membrana plasmática, que apresenta inúmeras convoluções e um tipo de material granular, que se acumula acima e abaixo desta membrana (em maior quantidade) (Figura 3). Marcação positiva para GRA1, 3 e 7 (Figura 4) foi observada nesta membrana. GRA3 se mostrou mais abundante na região granular da parede.

Vesículas de diferentes diâmetros foram observadas na região granular da parede cística quando o material foi processado pela técnica de ósmio-imidazol, o que indica

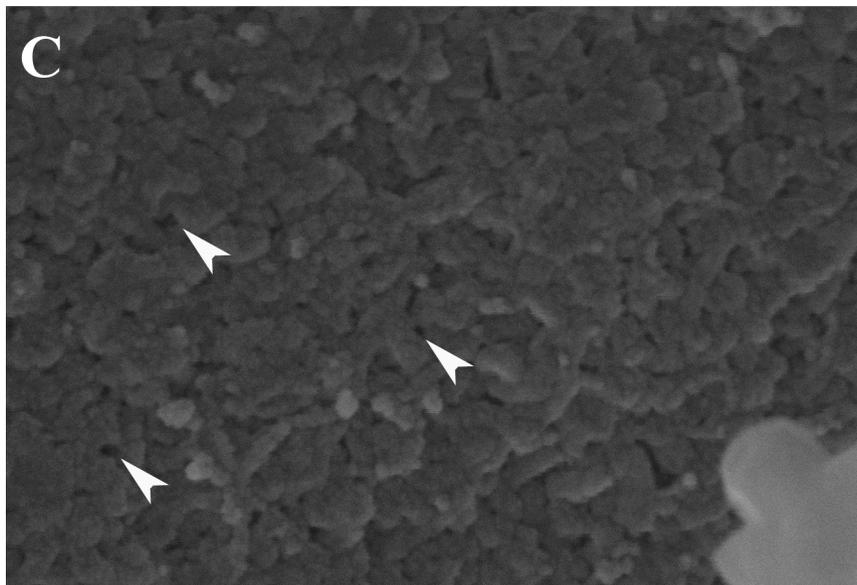
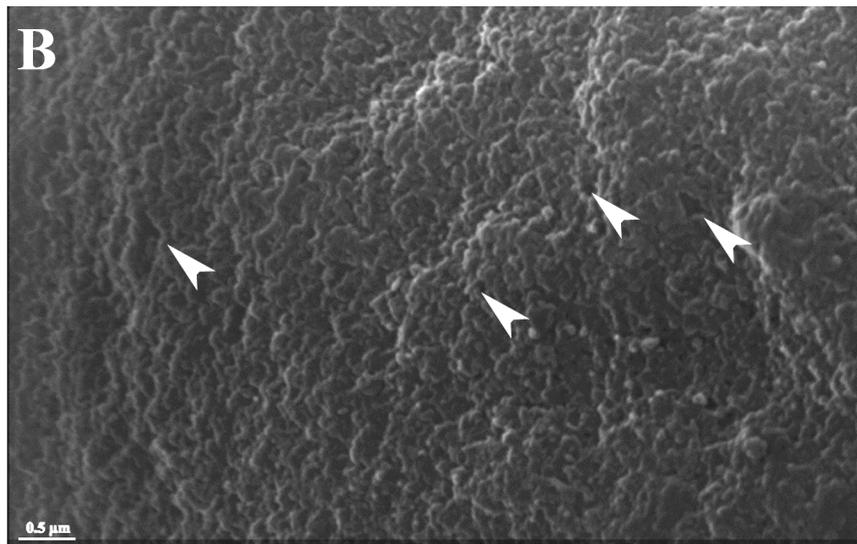
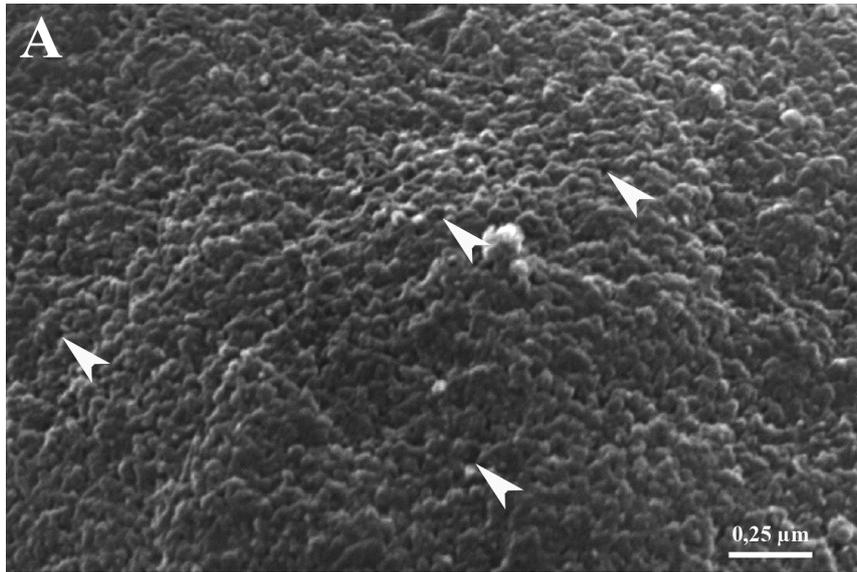
natureza lipídica na sua composição, (Figura 5A). Cortes ultrafinos e réplicas metálicas de cistos criofraturados seguido de *etching* mostraram a presença de estruturas tubulares na região granular da parede cística (Figura 5B). Estes túbulos apresentaram uma superfície lisa e um diâmetro médio de 65 nm. Diversas vesículas com diâmetro médio de 67 nm foram também observadas na região granular da parede (Figura 5B). Muitas foram encontradas próximas aos túbulos ali observados. Vesículas também foram observadas próximas a esta parede (Figura 3).

Tabela 1 – Dimensões das estruturas encontradas na matriz de cisto da cepa Me49 de *Toxoplasma gondii*.

<u>Estruturas do Cisto</u>	<u>Dimensões (média ± desvio padrão)</u>
Parede cística	241,51 ± 107,19 nm (50 – 500 nm)
Túbulos da matriz	35,79 ± 3,15 nm (33,34 – 40 nm)
Vesículas da matriz	72,56 ± 24,43 nm (32 – 140 nm)
Vesículas com material granular	512,50 ± 161,11 nm (250 – 700 nm)

Diversos perfis das estruturas em diferentes cortes ultrafinos, provenientes de diferentes preparações de cistos, foram utilizados para esta avaliação.

Figura 2 - Parede do cisto tecidual da cepa Me49 isolado de cérebros de camundongos na fase crônica da infecção. **A** – Por microscopia eletrônica de varredura convencional observamos a parede cística sendo formada por estruturas filamentosas que se dispõem em um arranjo irregular. Estruturas semelhantes a poros estão presentes na superfície desta parede (cabeças de seta). **B** – Por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo a parede cística apresentou o mesmo aspecto de quando observada em preparações para a varredura convencional, com as mesmas estruturas semelhantes a poros (cabeças de seta). **C** – O aspecto da parede não difere quando comparado com cistos observados de fragmentos de cérebros na fase crônica da infecção que foram congelados e fraturados a baixa temperatura antes da observação no microscópio eletrônico de varredura. Estruturas semelhantes a poros, como as que são observadas em **A e B**, também estão presente na superfície da parede (cabeças de seta).



200 nm

Mag = 70.12 KX
WD = 9.0 mm

EHT = 16.00 kV

Signal A = SE1 Date : 2 Oct 2009
Photo No. = 1862 Time : 11:04:07



Figura 3 - Cortes ultrafinos de cistos da cepa Me49 isolados de cérebros de camundongos na fase crônica da infecção mostrando a organização da parede cística. **A** - A estrutura filamentosa (asterisco) da parede encontra-se tanto abaixo da membrana (setas) como acima desta. **B** - Esta membrana apresentou um aspecto irregular, com várias invaginações. Podemos observar diversas vesículas (V) próximas à parede cística.

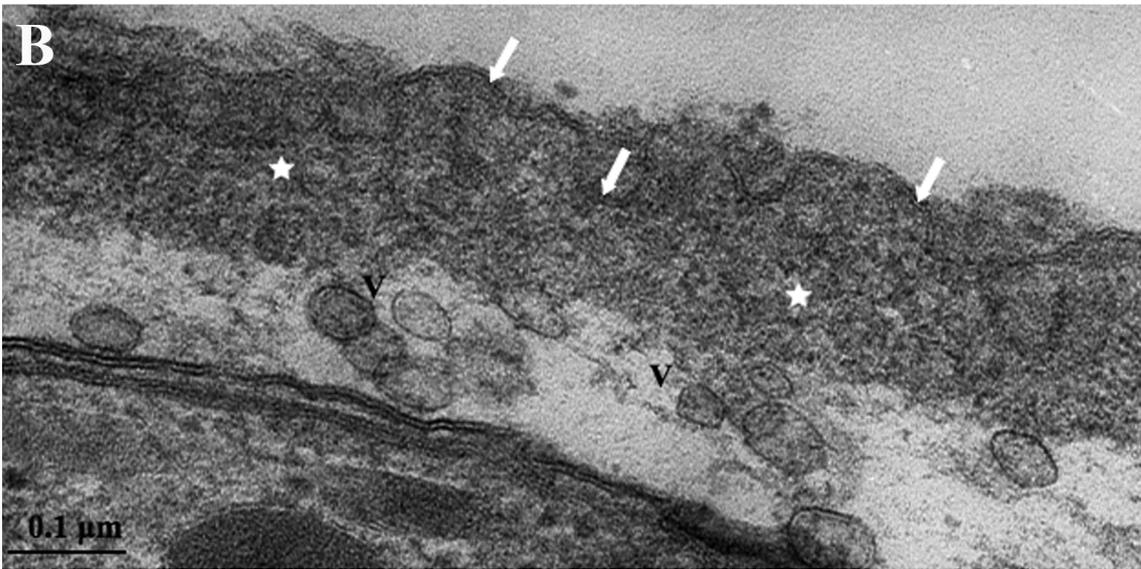
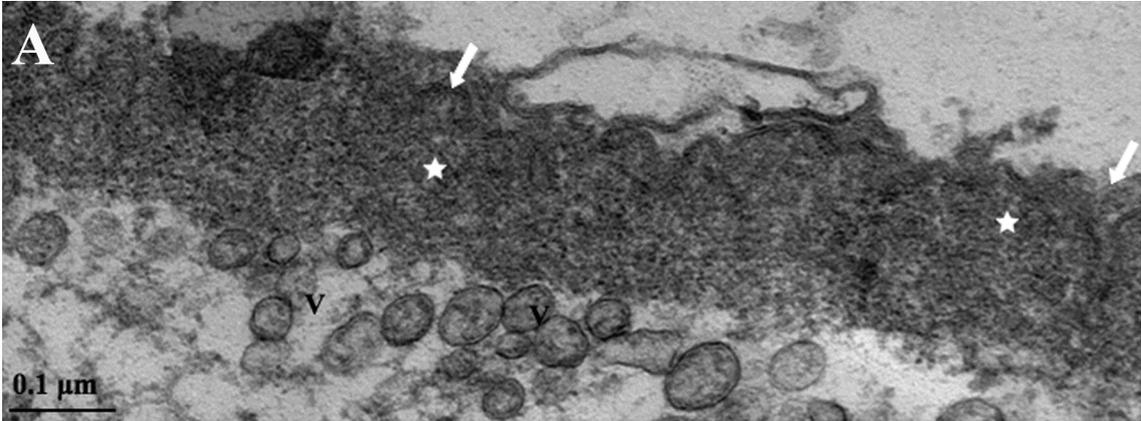


Figura 4 - Imunocitoquímica para GRA1, 3 e 7 em cortes de cistos da cepa Me49 isolados de cérebros de camundongos na fase crônica da infecção. **A** – Podemos observar que houve marcação para GRA1 (setas) na parede cística neste crio-corte do cisto e no grânulo denso. **B** – Marcação de GRA3 (cabeças de seta pretas) e GRA7 (cabeças seta brancas) na parede cística de cistos incluídos em resina hidrofílica Unicryl.

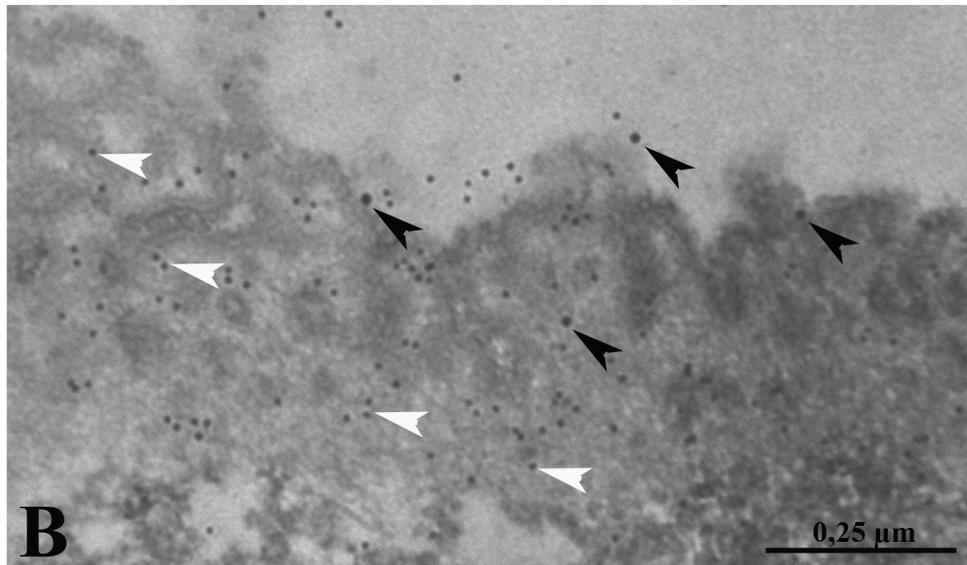
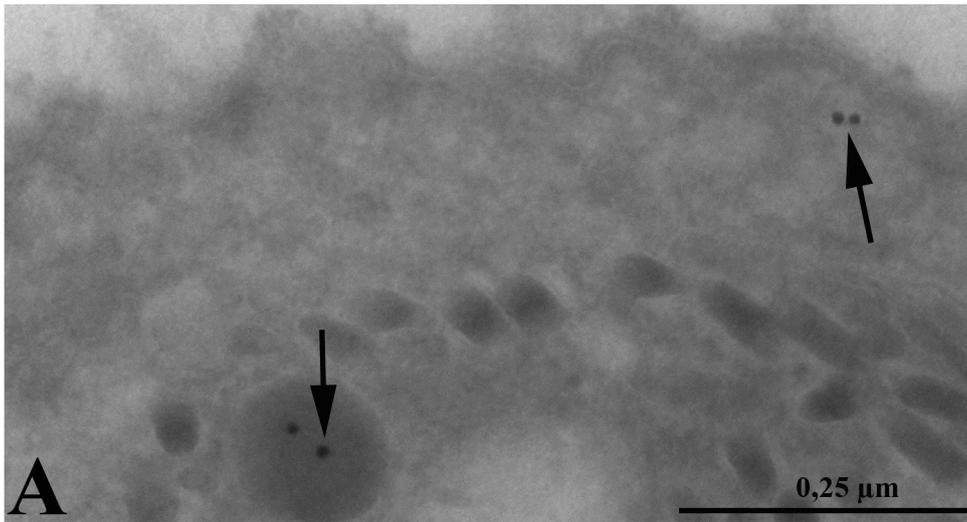
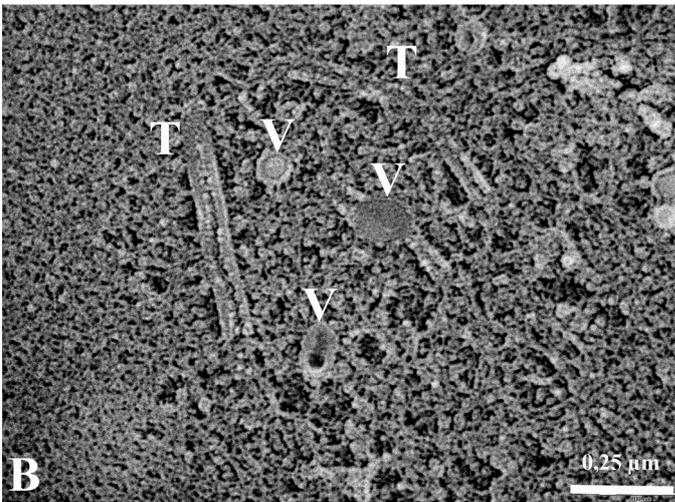
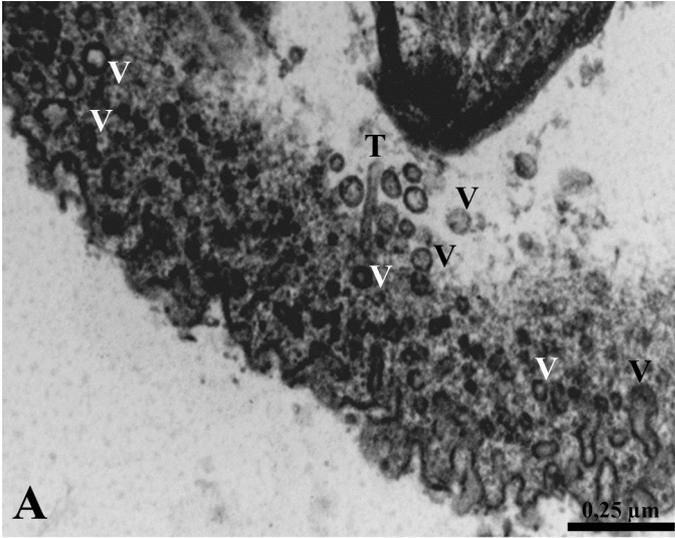


Figura 5 - A – Uma grande quantidade de vesículas (V) foi evidenciada na parede cística quando processamos os cistos da cepa Me49 isolados de cérebros de camundongos na fase crônica da infecção pela técnica de ósmio-imidazol. Além destas vesículas, túbulos (T) também foram observados em cortes ultrafinos da parede cística. Através desta técnica também podemos observar a estrutura irregular da membrana que compõe a parede cística. **B** – Réplicas metálicas de cistos criofraturados seguido de *etching* profundo também mostraram vesículas (V) e túbulos (T) na parede cística, com as mesmas dimensões daquelas observadas por corte ultrafino.



A organização estrutural dos componentes da parede foi melhor observada quando os cistos foram criofraturados e posteriormente sofreram *etching* (Figura 6). Ao observar as réplicas metálicas deste material, notamos que a parede se apresenta em duas camadas: uma mais externa, próxima a superfície, fina e com o material em um arranjo mais compacto; e uma mais interna, próxima a matriz cística, mais espessa e com o material em uma organização mais frouxa.

Ao incubarmos os cistos com o fluoróforo Lucifer Yellow, esta parede mostrou ser uma estrutura permeável, uma vez que observamos este corante na matriz do cisto (Figura 7). Este corante não foi captado pelos bradizoítos.

Figura 6 - Réplicas metálicas de cistos da cepa Me49 isolados de cérebros de camundongos na fase crônica da infecção que foram criofraturados, seguido de *etching* profundo. **A e B** – A parede cística se divide em duas camadas: uma mais externa (setas), próxima à superfície, com o arranjo mais compacto, e uma mais interna (asterisco), próxima à matriz do cisto, com um arranjo mais frouxo. **C** – Maior aumento da organização dos filamentos na parede cística, na camada mais frouxa.

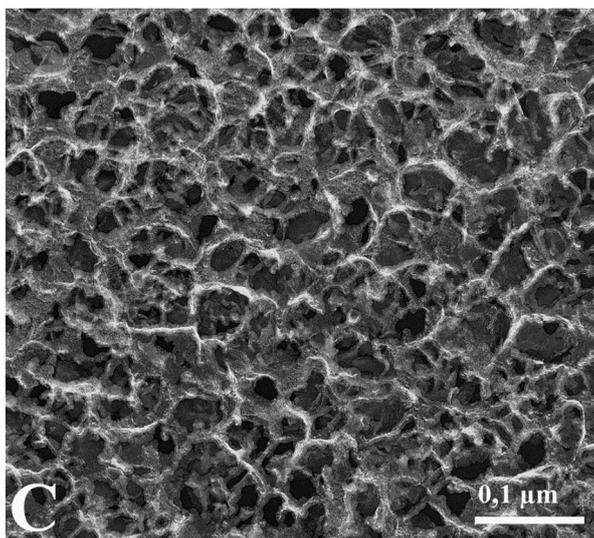
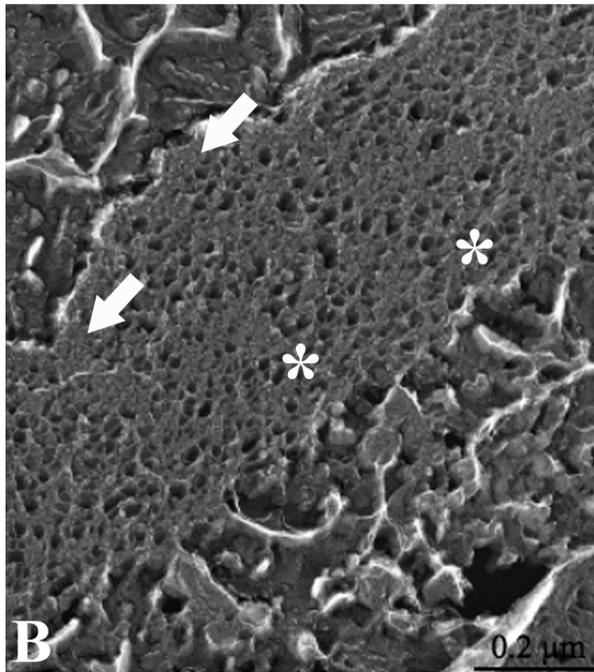
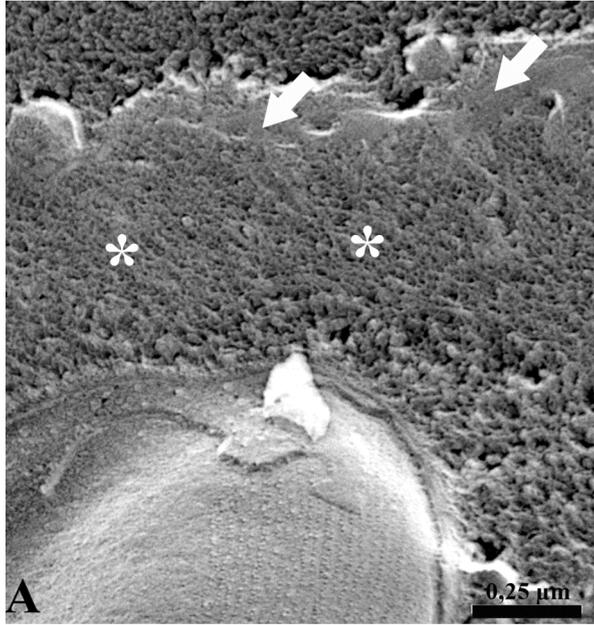
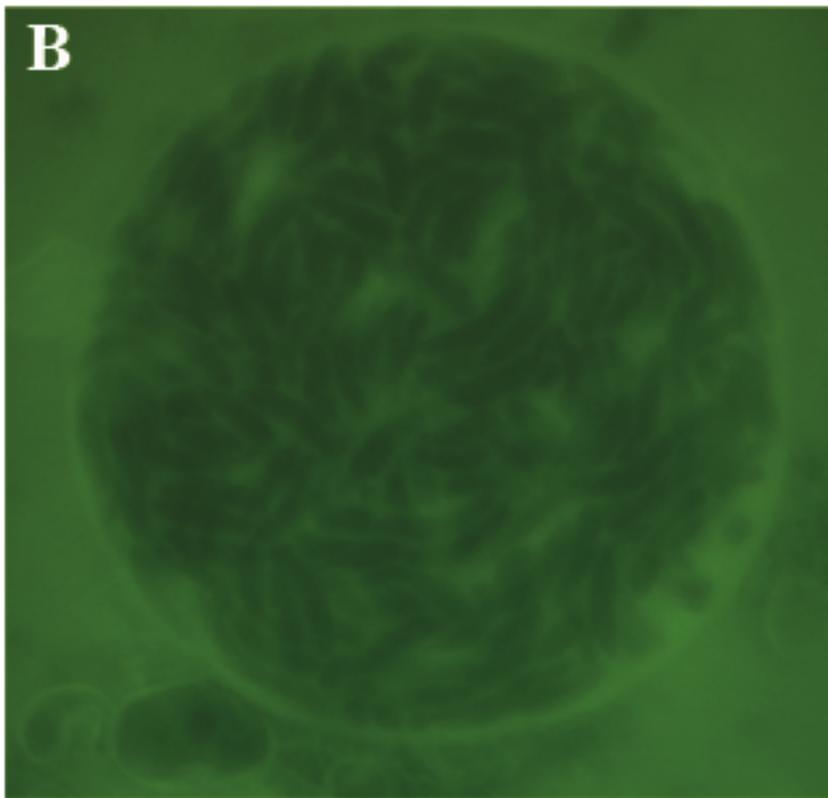
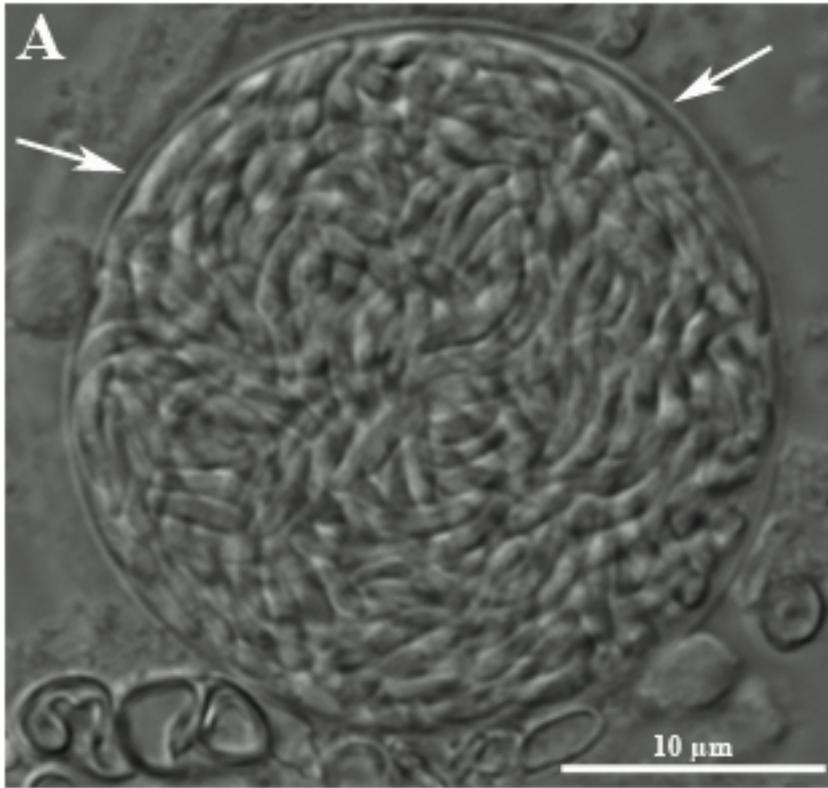


Figura 7 - A parede cística (setas) é permeável a pequenos solutos, como o corante Lucifer Yellow (457 Da). **A** – Foto de microscopia óptica de contraste interferencial do cisto da cepa Me49 de *Toxoplasma gondii* isolado. **B** – Foto de microscopia de fluorescência mostrando o corante Lucifer Yellow se acumulando na matriz do cisto, não sendo captado pelos bradizoítos.



1.3 – A matriz do cisto

A matriz do cisto de *T. gondii* é composta por um material filamentososo e eletrondenso, vesículas de variados diâmetros e por estruturas tubulares, como observado em cortes ultrafinos e nas réplicas metálicas (Figuras 8 e 11).

Estas estruturas tubulares estavam distribuídas por toda a matriz, apresentando diâmetro entre 30 e 50 nm de espessura, como observado por cortes ultrafinos e nas réplicas metálicas (Figura 8A e B) (Tabela 1). Observamos os bradizoítos secretando estas estruturas na matriz, através de uma invaginação no seu pólo posterior (Figura 8C). Para comprovarmos que estes túbulos estariam organizados em uma rede, semelhante à observada no vacúolo parasitóforo, utilizamos o aparelho de DualBeamTM (FEI Company). Neste aparelho pode ser usado um feixe de íons focalizado para desbastar a superfície de um material. Posteriormente, se faz a observação, neste mesmo aparelho, da superfície debastada por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, possibilitando uma alta resolução do material. Utilizamos esta técnica para desbastar a parede do cisto isolado, possibilitando a observação das estruturas presentes na matriz cística. A observação deste material permitiu a determinação que estes túbulos estão organizados em uma rede, conectando os bradizoítos uns aos outros e também à parede (Figura 10). Estes túbulos foram reconhecidos por anticorpos contra GRA 1, 3 e 7 (Figura 9).

As vesículas menores apresentaram um diâmetro entre 50 e 140 nm (Tabela 1), com algumas destas apresentando uma membrana mais eletrondensa e um fino *coat* em sua superfície, como observado em corte ultrafino (Figura 11A) e réplica metálica (Figura 11B). Algumas destas vesículas apresentaram marcação para os anticorpos contra GRA 1, 3 e 7 (Figura 12). Nem todas apresentaram marcação para GRA1 (Figura

12A e B). Algumas vesículas apresentaram marcação somente para GRA7 (Figura 12D), somente para GRA3 (Figure 12E) ou para as duas GRAs (Figura 12C).

Vesículas com diâmetros grandes (entre 250 e 700 nm) (Tabela 1) (Figura 13) também foram observadas na matriz. Estas vesículas apresentaram uma superfície lisa, com o seu lúmen contendo um material filamentososo, semelhante ao material que forma a parede cística. Estas vesículas brotam da parte posterior dos bradizoítos, sendo depois observadas em contato com a parede cística (Figuras 14). Diferentes etapas do caminho percorrido por estas grandes vesículas são mostradas na Figura 14A-F.

Para podermos confirmar que o material filamentososo observado no lúmen destas vesículas poderia ser de natureza glicídica, realizamos o protocolo estabelecido por Thiéry (1967), que evidencia grupamentos carboxílicos para observação ultraestrutural. Como controle positivo desta citoquímica, os grânulos de amilopectina no citoplasma dos bradizoítos também se mostraram positivamente marcados (Figura 15A). A Figura 15B mostra uma vesícula presente na matriz cística contendo material polissacarídico, similar às grandes vesículas observadas em cistos processados rotineiramente. Processando os cistos pelo protocolo estabelecido por Angermüller e Fahimi (1982), onde o ósmio-imidazol evidencia lipídeos insaturados, observamos algumas destas grandes vesículas com conteúdo eletrondenso, sugerindo que a sua composição incluía a presença de lipídeos insaturados (Figura 16).

Figura 8 - A – Corte ultrafino de cisto da cepa Me49 isolado de cérebro de camundongo na fase crônica da infecção mostrando os elementos presentes na matriz do cisto, como túbulos (T) e vesículas (V) próximos a bradizoítos (B). **B** – Réplica metálica de um cisto de Me49 isolado de cérebro de camundongo na fase crônica da infecção que foi criofaturado, seguido de *etching* profundo. Podemos observar túbulos morfológicamente semelhantes aos observados nos cortes ultrafinos, próximos a um bradizoíto (B). **C** - Podemos observar que estas estruturas tubulares (seta) são secretadas por uma invaginação na parte posterior do bradizoíto (b).

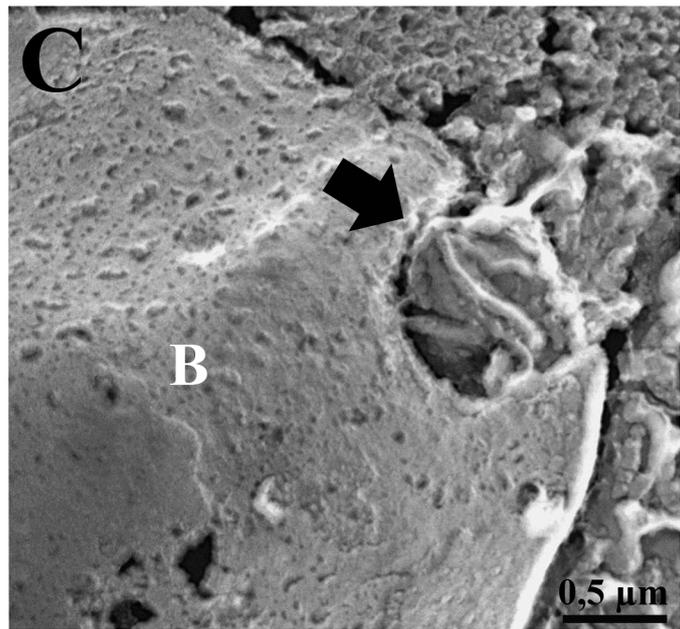
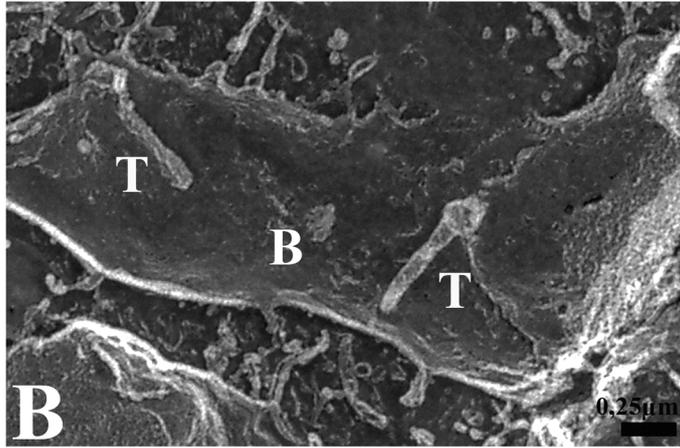
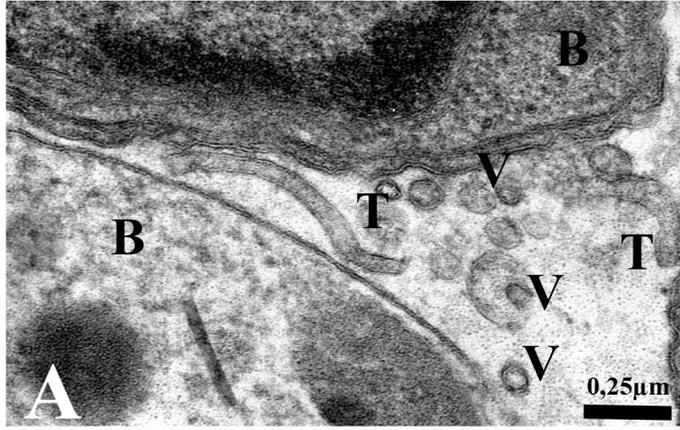


Figura 9 - Imunocitoquímica para GRA1, 3 e 7 em cortes de cistos da cepa Me49 isolados de cérebros de camundongos na fase crônica da infecção. **A** – Podemos observar que houve marcação para GRA1 (setas) no túbulo na matriz do cisto em criocorte. **B** – Marcação de GRA7 (seta) nos túbulos na matriz de cistos incluídos em resina hidrofílica.

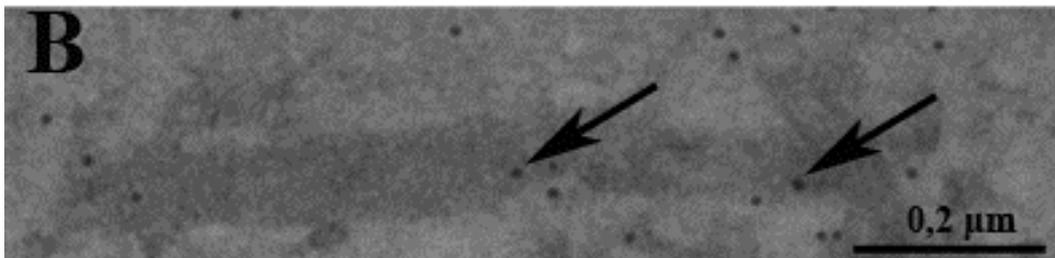
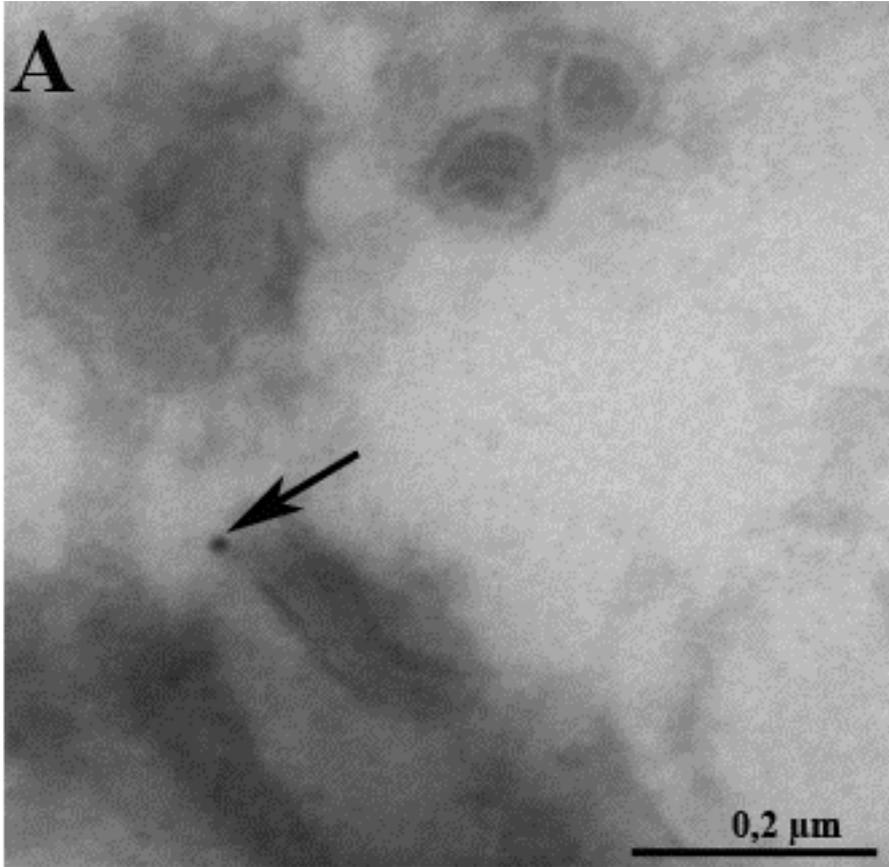


Figura 10 - Cistos da cepa Me49 isolados processados como para microscopia eletrônica de varredura foram desbastados com o uso de um feixe de íons concentrado (FIB) no aparelho DualBeam para desbastar a parede e observarmos a matriz no modo de microscopia de varredura por emissão de campo. Enquanto desbastávamos a parede imagens do material foram obtidas. **A** – o cisto a ser desbastado. **B** – Com o uso do FIB, foi possível desbastar a parede e observar a matriz do cisto. **C e D** – Maior aumento da região revelada pelo uso do FIB. Podemos observar túbulos (setas) em um arranjo de rede, conectando os bradizoítos. **E** – Maior detalhamento do arranjo dos túbulos (setas), que conectam os bradizoítos. **F** – O cisto após o uso do FIB.

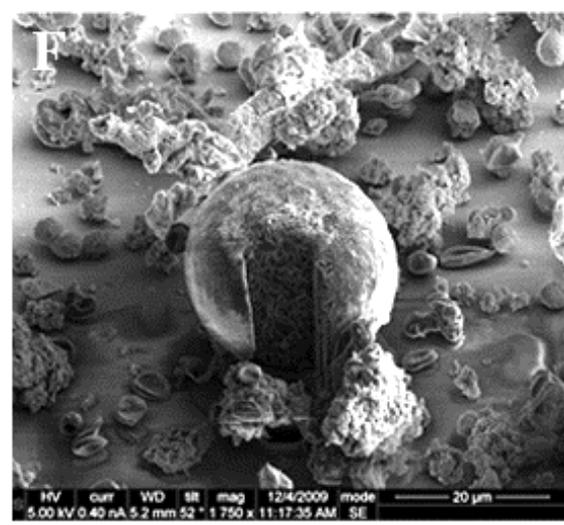
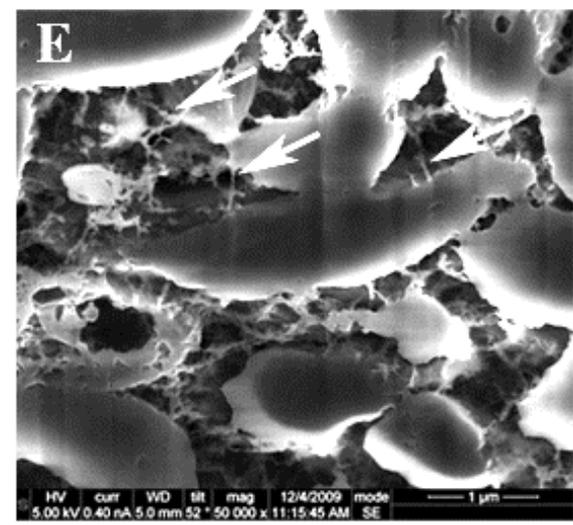
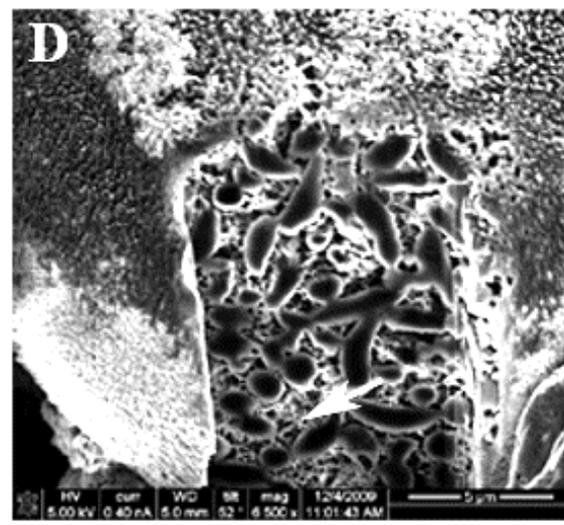
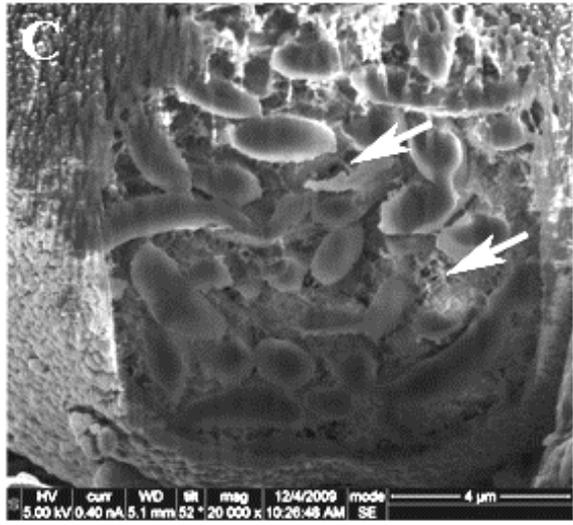
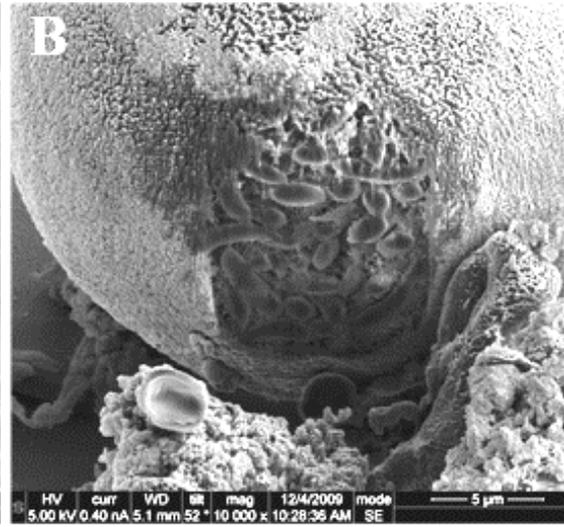
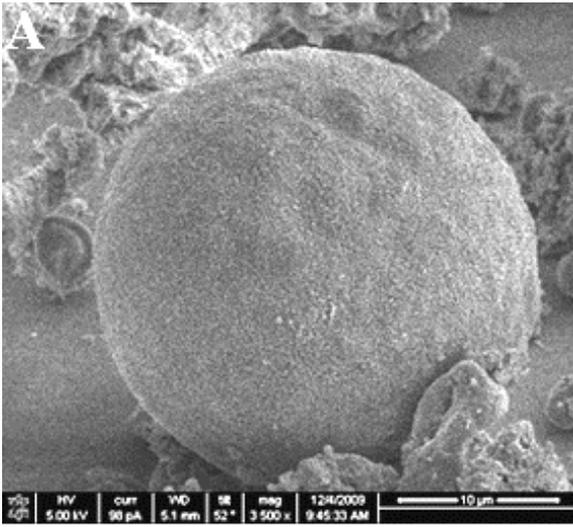


Figura 11 - A - Corte ultrafino de cisto da cepa Me49 isolado de cérebro de camundongo na fase crônica da infecção mostrando vesículas (V) na matriz do cisto. Algumas destas vesículas apresentaram uma membrana mais eletrondensa e um fino *coat* em seu entorno (seta). Podemos observar também o material amorfo presente na matriz do cisto (asterisco). **B** – Réplica metálica de um cisto de Me49 isolado de cérebro de camundongo na fase crônica da infecção criofaturado, seguido de *etching*, mostrando uma vesícula com este material eletrondenso na sua superfície.

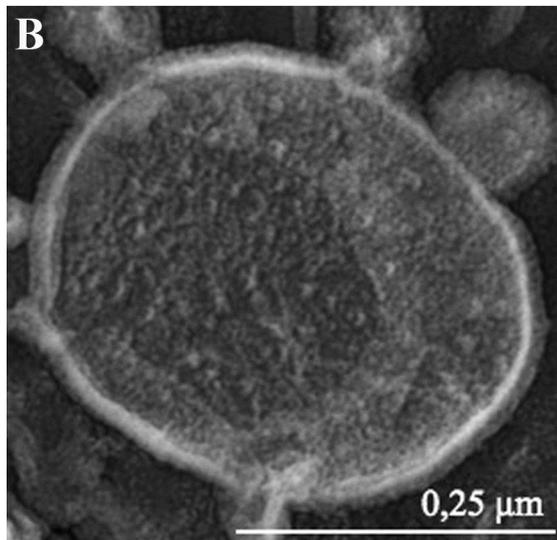
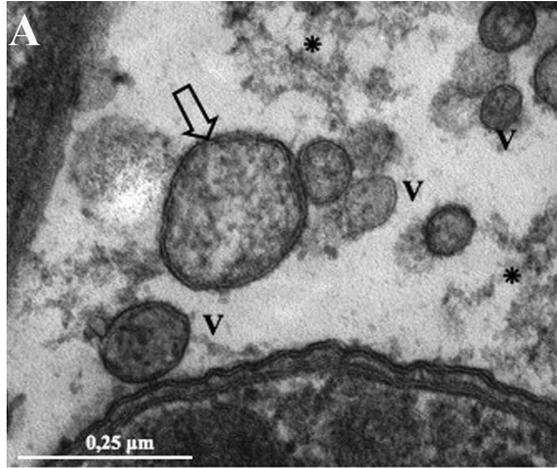


Figura 12 - Imunocitoquímica para GRA1, 3 e 7 em cortes de cistos de Me49 isolados de cérebros de camundongos na fase crônica da infecção. **A e B** – Podemos observar que houve marcação para GRA1 (setas) em algumas vesículas na matriz do cisto em crio-corte. Em algumas vesículas não houve marcação. **C** – Marcação de GRA3 (seta branca) e GRA7 (seta preta) na mesma vesícula em cistos incluídos em resina hidrofílica. **D** – Em algumas vesículas só apresentaram marcação de GRA7. Podemos observar marcação na matriz do cisto também. **E** – Algumas vesículas apresentaram marcação somente para GRA3.

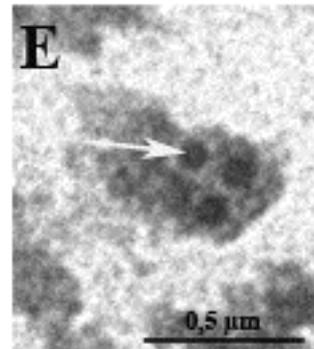
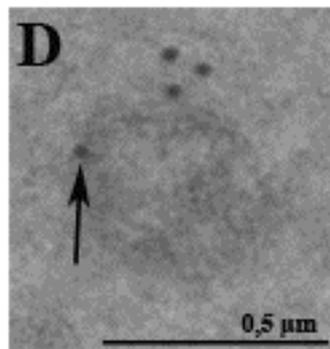
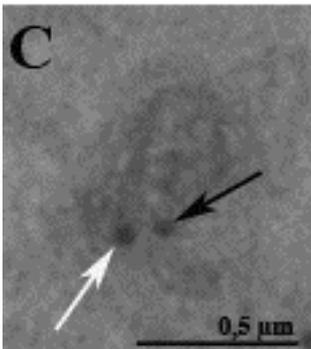
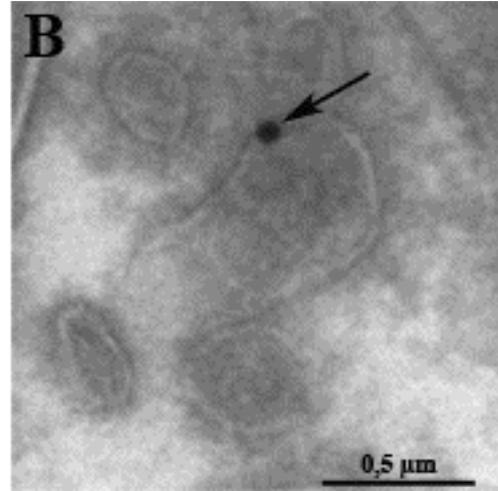
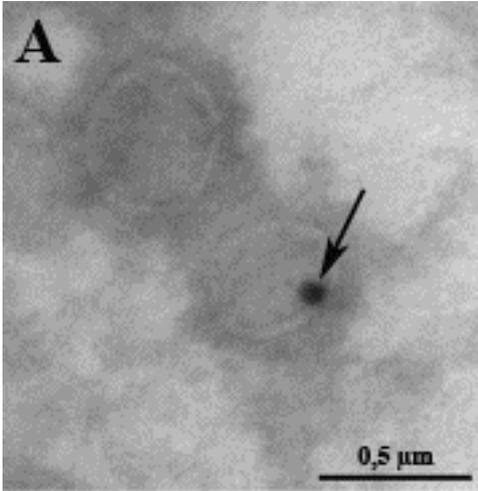


Figura 13 - Vesículas (setas) contendo um material granular foram observadas na matriz de cistos de Me49 isolados de cérebros de camundongos na fase crônica da infecção. **A** - O material granular contido nestas vesículas é muito semelhante ao material que constitui a parede cística (cabeças de seta). Estas vesículas apresentaram um diâmetro maior que vesículas normalmente encontradas na matriz (V). **B** - Estas vesículas foram também observadas bem no interior da matriz cística, entre bradizoítos.

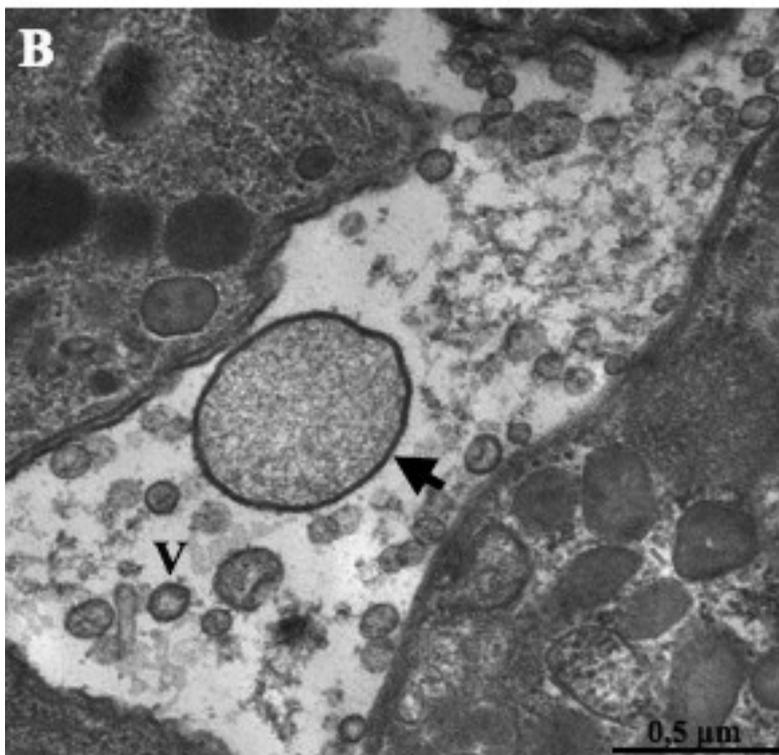
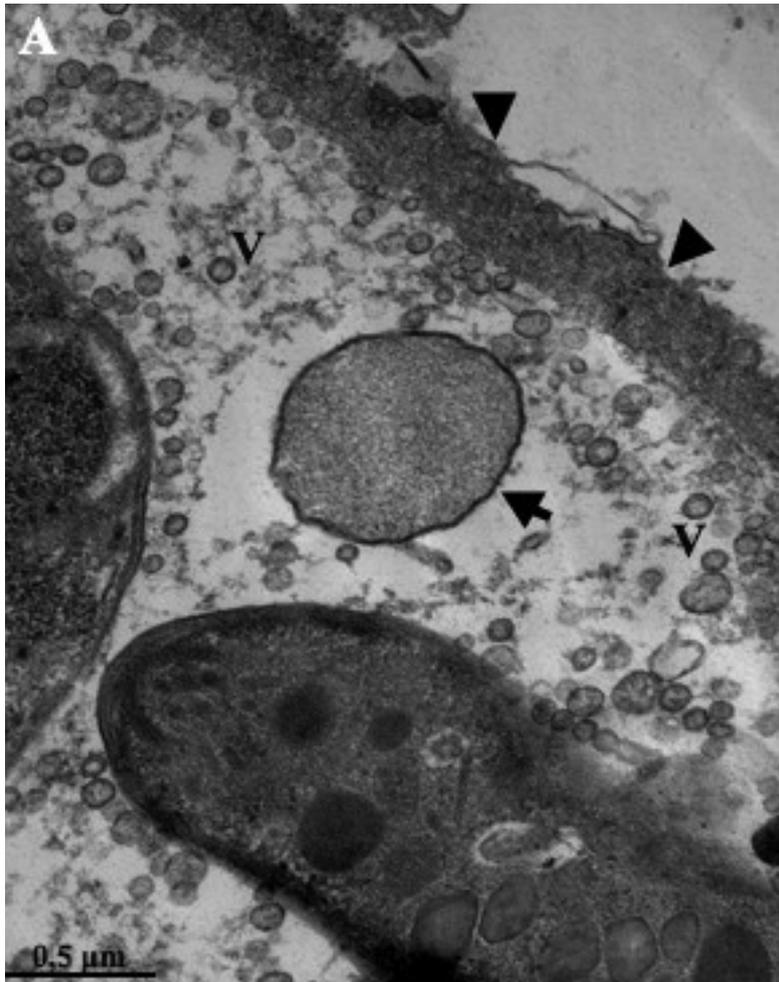


Figura 14 - A até D – Cortes ultrafinos mostrando diferentes etapas do caminho percorrido pelas grandes vesículas (cabeças de seta brancas) presentes na matriz de cistos da cepa Me49 isolados de cérebros de camundongos na fase crônica da infecção. Podemos observar pequenas vesículas (Vp) na matriz do cisto, bem como dentro da parede (seta branca). **A e B** – Brotamento e liberação das vesículas na matriz cística. O conteúdo destas vesículas apresentou a mesma granulosidade que os elementos que compõem a parede cística (asterisco), como observado nos Insets 1 e 2. **C e D** – Contato destas grandes vesículas com a parede cística. Na **D**, podemos observar um contato mais íntimo (seta preta) com a parede cística. **E e F** – Réplicas metálicas de cisto da cepa Me49 isolado de cérebro de camundongo na fase crônica da infecção, que foi criofraturado, seguido de *etching* profundo. Podemos observar o processo de brotamento (cabeças de seta preta) das grandes vesículas (Vg) pelos bradizoítos (B).

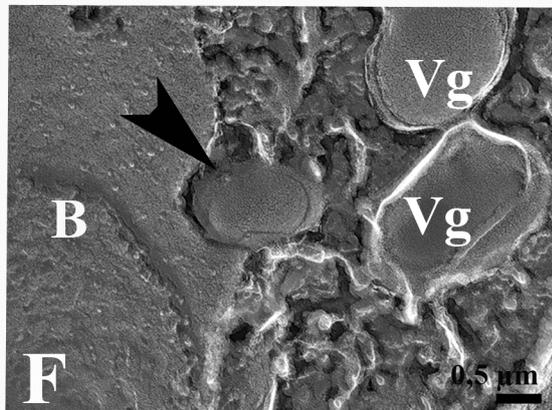
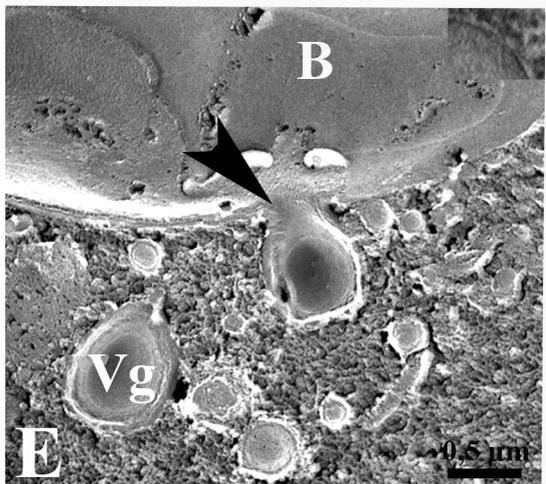
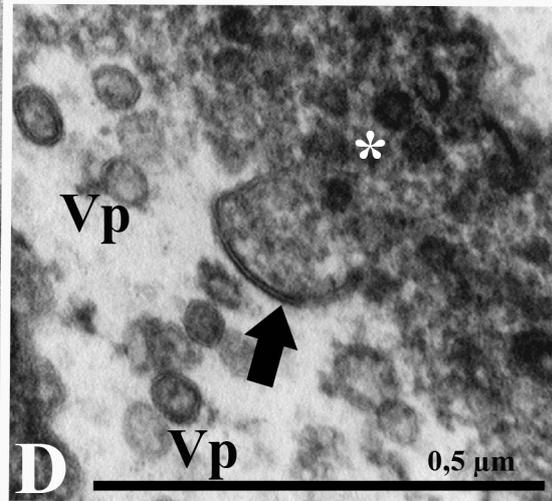
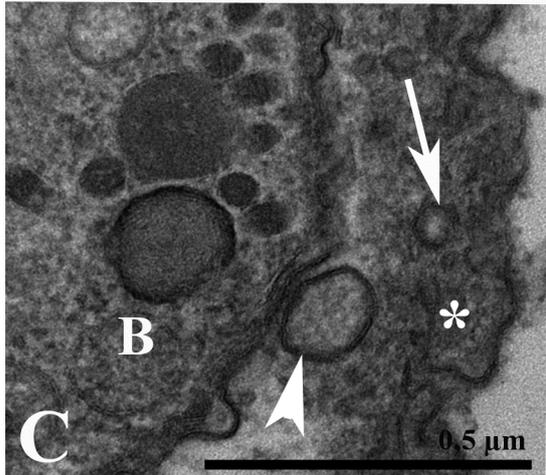
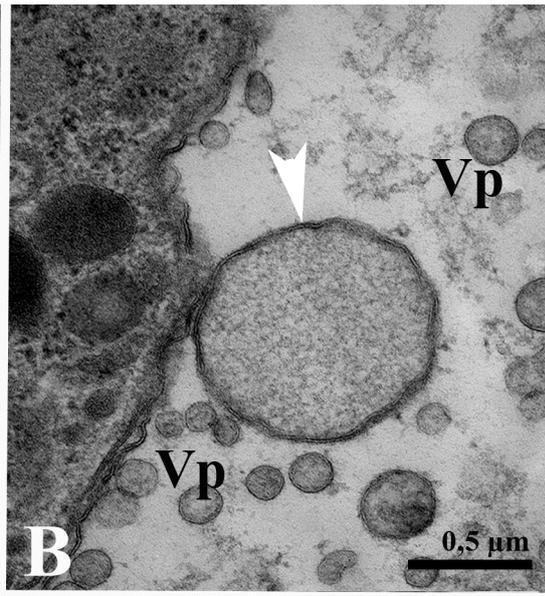
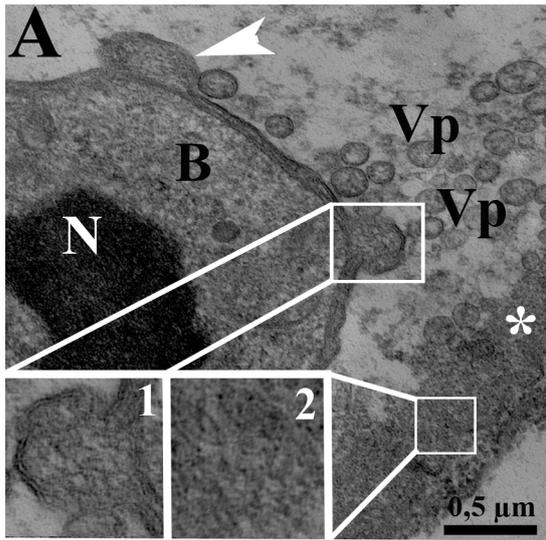


Figura 15 - Cistos de Me49 isolados de cérebros de camundongos na fase crônica da infecção foram processados para citoquímica de carboidratos. **A** – Podemos observar os grânulos de amilopectina (setas) encontrados no citoplasma dos bradizoítos com reação positiva. **B** – Uma vesícula na matriz do cisto apresentou em seu lúmen material polissacarídico (seta grossa).

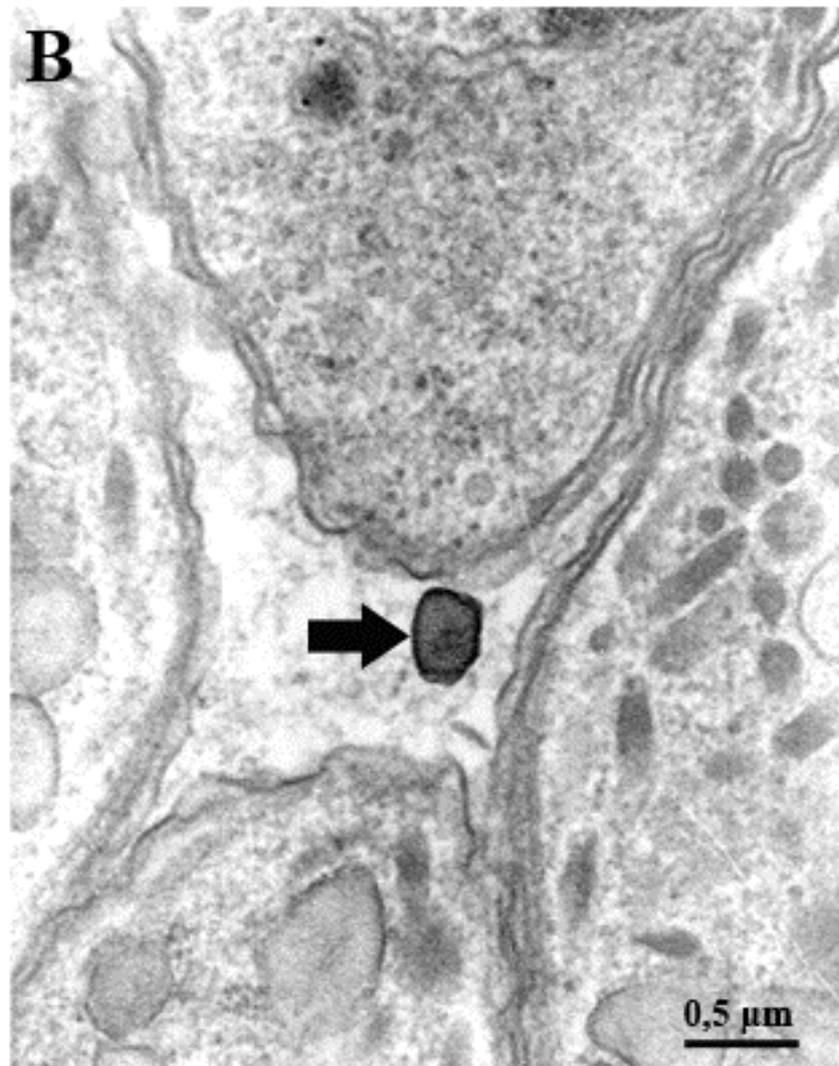
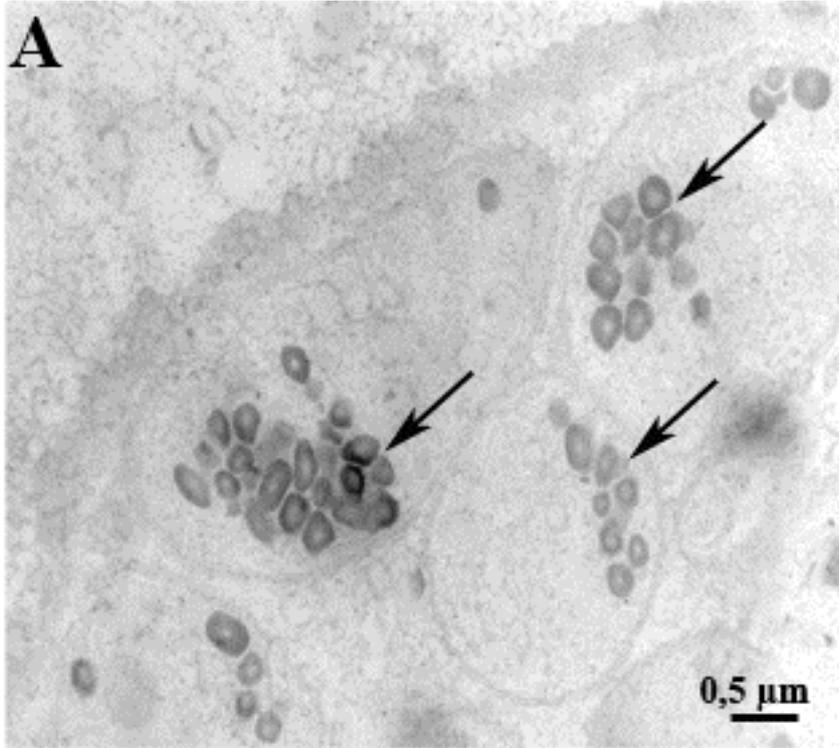
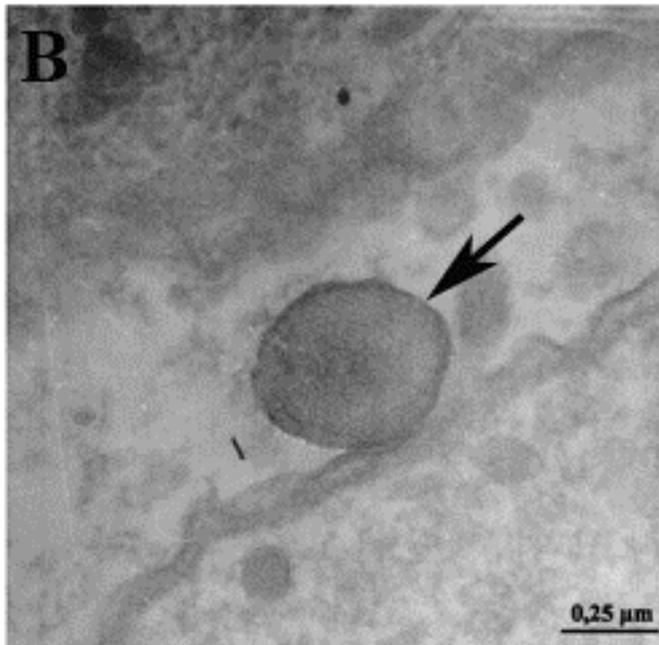
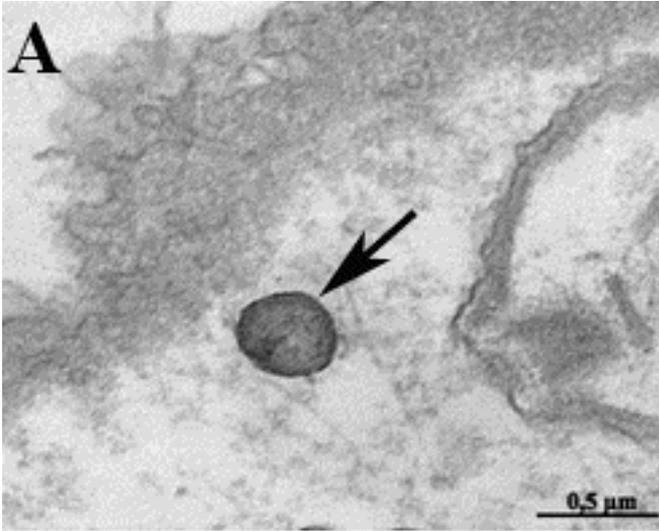


Figura 16 - Cisto de Me49 isolado de cérebro de camundongo na fase crônica da infecção processado para a técnica de ósmio-imidazol. **A** - Podemos observar uma vesícula contendo material lipídico (seta) próxima à parede cística. **B** - Podemos observar uma vesícula contendo material lipídico (seta) na matriz de cisto, com tamanho semelhante às grandes vesículas observadas na matriz de cistos processados de maneira convencional.



2 – Diferenças morfológicas entre os bradizoítas e os taquizoítas

2.1 – Róptrias

Cortes ultrafinos de taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* mostraram as róptrias na parte anterior do parasito, localizadas na parte apical, apresentando um conteúdo de eletrondensidade diferenciada (Figura 17A). A parte central do bulbo apresentou um aspecto esponjoso, em forma de colméia, e a periferia mais eletrondensa. O pescoço frequentemente apresentou um conteúdo bem eletrondenso e compactado. Quando os taquizoítas estavam em processo de invasão nas células hospedeiras, o conteúdo solúvel das róptrias foi secretado, sendo possível observar estruturas lamelares no lúmen do bulbo (Figura 17B). Estas estruturas também foram observadas em réplicas metálicas de taquizoítas criofraturados convencionalmente (Figura 18C), apresentando pouca ou nenhuma partícula intramembranar (PI). Partículas de 16,5 nm de diâmetro foram observadas no lúmen do bulbo (Figura 18C).

Em cortes ultrafinos de taquizoítos da cepa RH observamos vesículas de 120 nm de diâmetro na parte apical do taquizoíto, logo acima das róptrias (Figura 18A). Em réplicas metálicas de taquizoítos criofraturados observamos poucas PIs na face fraturada destas vesículas (Figura 18B).

Cortes ultrafinos de róptrias dos bradizoítos da cepa Me49 em cistos isolados de cérebros de camundongos na fase crônica da infecção apresentaram o mesmo aspecto que as dos taquizoítos: o pescoço bem eletrondenso, ligado ao bulbo com aspecto esponjoso (Figura 19). Como nas róptrias dos taquizoítos, observamos em cortes ultrafinos uma região de eletrondensidade intermediária conectando o pescoço e o bulbo (Figura 19A). Vesículas de 27 nm de diâmetro foram observadas próximas ao pescoço das róptrias dos bradizoítos (Figura 19B).

Figura 17 - A e B - Cortes ultrafinos de róptrias de taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Podemos observar que a róptria pode se apresentar dividida em duas regiões: o pescoço (seta branca), bem eletrondenso, e o bulbo (seta preta), com aspecto lacunar. Durante a invasão na célula hospedeira, o conteúdo da róptria é secretado, diminuindo a eletrondensidade da organela, evidenciando estruturas túbulo-vesiculares (asterisco) no lúmen do bulbo. **C** – Em réplicas metálicas de taquizoítas da cepa RH de *Toxoplasma gondii* observamos que estas estruturas lamelares (cabeças de seta brancas) no lúmen da róptria apresentam poucas PIs. Algumas partículas foram observadas no lúmen da organela (cabeça de seta preta).

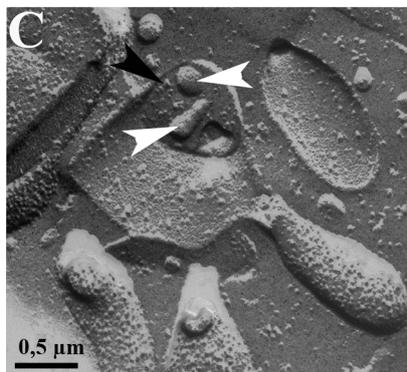
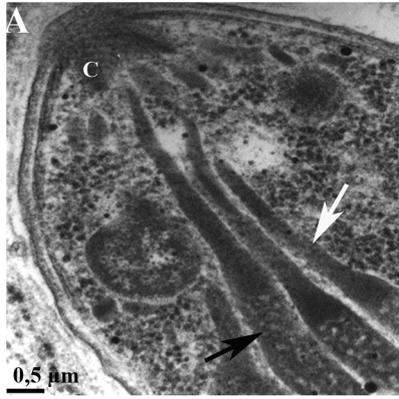


Figura 18 – A – Corte ultrafino de uma vesícula (seta) de aproximadamente 120 nm observada na extremidade apical de taquizoítos da cepa RH. Podemos observar alguns perfis de róptrias (R). **B** – Uma vesícula similar foi observada em réplica metálica de preparações de taquizoítos criofraturados. Podemos observar os microtúbulos subpeliculares (cabeças de seta).

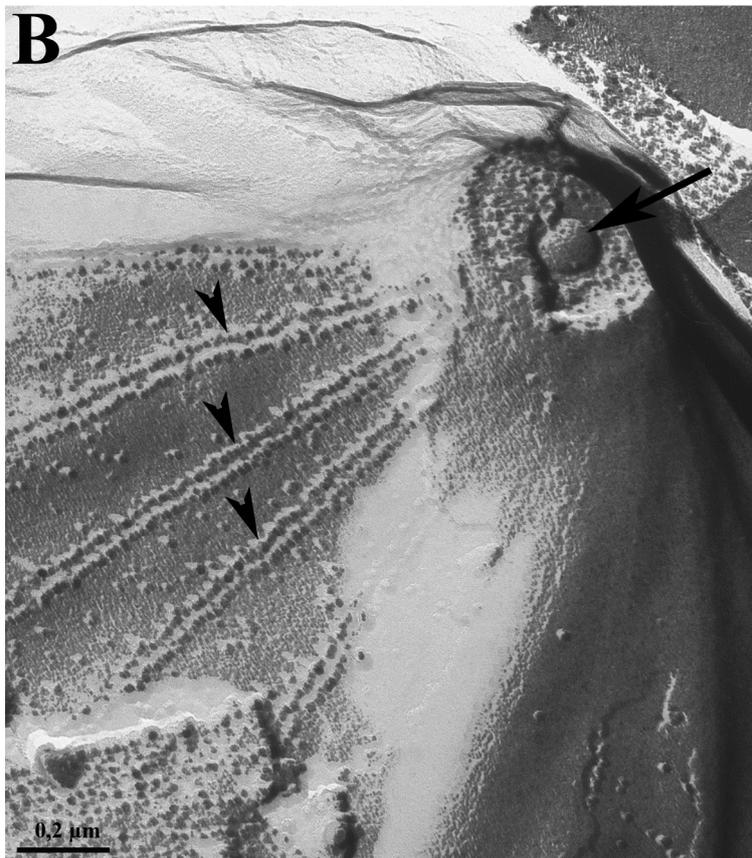
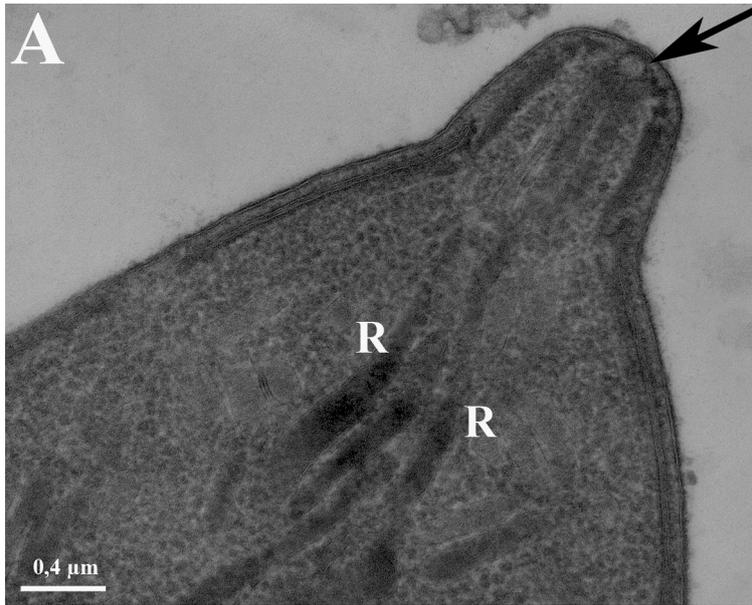
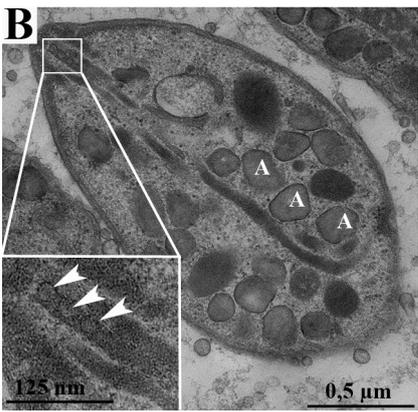
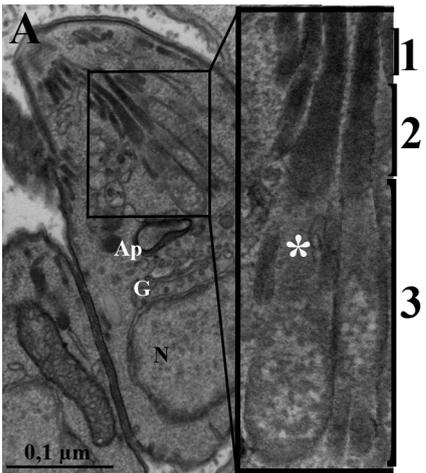


Figura 19 - Cortes ultrafinos de bradizoítos em cistos da cepa Me49 isolados de cérebro de camundongo na fase crônica da infecção. **A** - Podemos observar que a morfologia da róptria é semelhante à de taquizoítos da cepa RH: o pescoço eletrondenso (1), uma região de eletrondensidade intermediária (2), e o bulbo com aspecto amorfo (3). Algumas estruturas lamelares podem ser observadas no lumen do bulbo (asterisco). Ap – apicoplasto; G – complexo de Golgi. **B** – Observamos pequenas vesículas (cabeças de seta) próximas ou dentro do pescoço da róptria (Inset). A – grânulos de amilopectina.



Analisamos as faces de fratura da membrana da rópria de taquizoítas da cepa RH por criofratura convencional, determinando tamanho e distribuição de PIs na região do pescoço e no bulbo. Estas regiões apresentaram PIs em tamanho e distribuição variados (Figura 20) (Tabela 2). Na face E do pescoço a densidade das PIs foi de 11 PIs/ μm^2 , com PIs de diâmetro médio de 23,6 nm. Na face P a densidade foi maior – 75 PIs/ μm^2 , mas com PIs apresentando um diâmetro bem menor – de 9,25 nm, quando comparadas a face E. Na face E do bulbo, as PIs apresentaram um diâmetro médio de 14 nm, com uma densidade de 35 PIs/ μm^2 . Em réplicas de cistos de Me49 isolados de cérebro de camundongos na fase crônica da infecção, que foram criofaturados, seguido de *etching*, observamos PIs na face fraturada das róprias com um diâmetro médio de 22,5 nm (Figura 22).

Réplicas metálicas de preparações de taquizoítas da cepa RH e de bradizoítas de cistos da cepa Me49 isolados, onde estes materiais foram criofaturados seguido de *etching*, possibilitaram a observação de PIs tanto no pescoço quanto no bulbo de róprias, dispostas em um arranjo especial – em fileiras paralelas, ao longo de toda a circunferência destas regiões, inclusive na área de ligação entre elas (Figuras 20C, 21A e 22A e B). Algumas partículas de 13,9 nm foram observadas na parte basal do bulbo das róprias de bradizoítos (Figura 22C). Curiosamente, observamos estruturas semelhantes a poros de 26 nm de diâmetro na face fraturada do bulbo (Figura 21C).

Utilizamos o antibiótico filipina para localizar ultraestruturalmente esteróis na face da membrana das róprias de taquizoítas criofaturados. A interação entre o antibiótico e o esterol forma um complexo macromolecular, facilmente observado nas réplicas metálicas. A membrana externa dos taquizoítos apresentou tais complexos (Figura 23A), entretanto nenhum complexo foi observado na face fraturada das róprias (Figura 23B).

Os micronemas apresentaram-se conectados uns aos outros por finos filamentos de 7,7 nm de diâmetro e 16,2 nm de comprimento (Figura 21B e D), tanto em taquizoítos da cepa RH quanto em cistos da cepa Me49, que foram criofraturados, seguido de *etching*. Nenhuma ou muito poucas PIs foram observadas na face fraturada destas organelas em réplicas metálicas. Não observamos nenhuma conexão entre os micronemas e as róptrias.

Tabela 2 – Determinação do diâmetro médio e do número de partículas intramembranares por área nas faces de fratura das róptrias de taquizoítos da cepa RH em preparações para criofratura convencional.

	Face P		Face E	
	<u>Diâmetro</u>	<u>Partículas por área</u>	<u>Diâmetro</u>	<u>Partículas por área</u>
Pescoço	9.25 nm	75 PIs/ μm^2	23.6	11 PIs/ μm^2
Bulbo	nd	nd	14	35 PIs/ μm^2

nd – não determinado

Figura 20 - Róptrias observadas em réplicas metálicas de taquizoítos da cepa RH processados por criofratura convencional. **A** - Podemos observar PIs (setas) dispostas ao longo da face fraturada da róptria. M – micronemas. **B** - PIs são observadas na parte basal do bulbo. **C** – PIs estão distribuídas em fileiras paralelas tanto na face E quanto na face P.

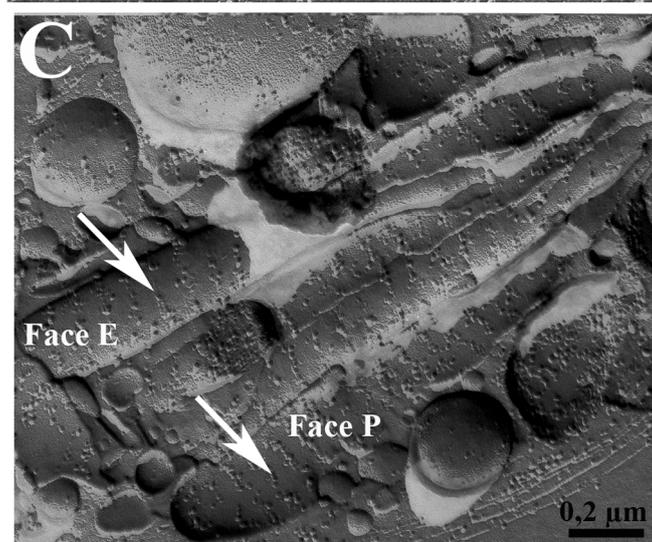
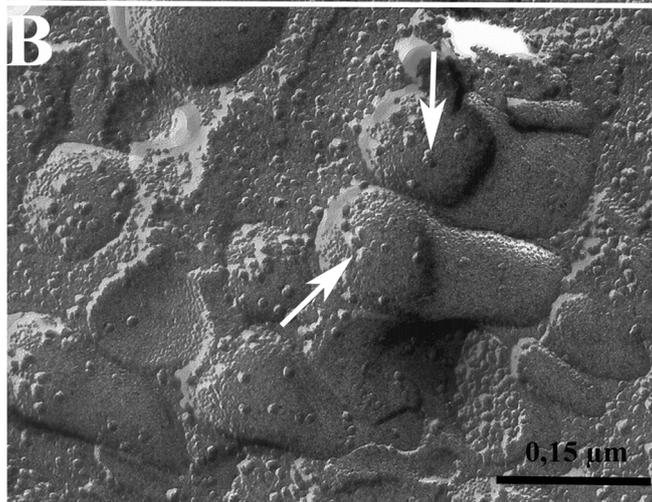
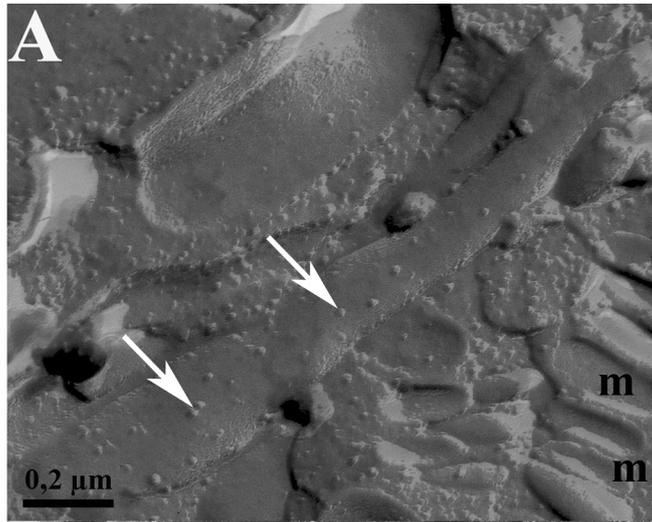


Figura 21 - Réplicas metálicas de taquizoítos da cepa RH criofraturados e submetidos a *etching* profundo. **A** - Podemos observar a disposição em fileira destas PIs na face fraturada das róptrias (Inset). **B** – Podemos observar a distribuição dos micronemas (m) e das róptrias (r) na parte apical do taquizoíta. PIs (setas) são observadas na face fraturada das róptrias. **C** - Podemos observar poros (cabeças de seta brancas) e PIs (setas) na face fraturada das róptrias (R).. No Inset da figura **C** podemos observar em maior detalhe o poro. **D** - Os micronemas (m) na parte apical dos taquizoítas apresentaram pequenas ligações (cabeças de seta pretas), conectando uns aos outros, como melhor observado no Inset.

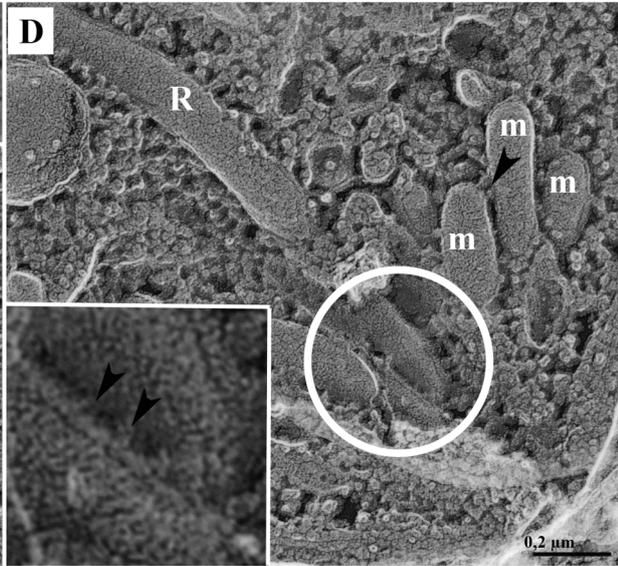
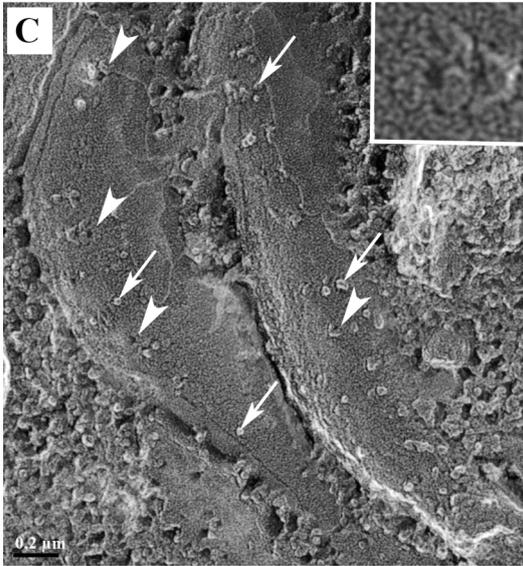
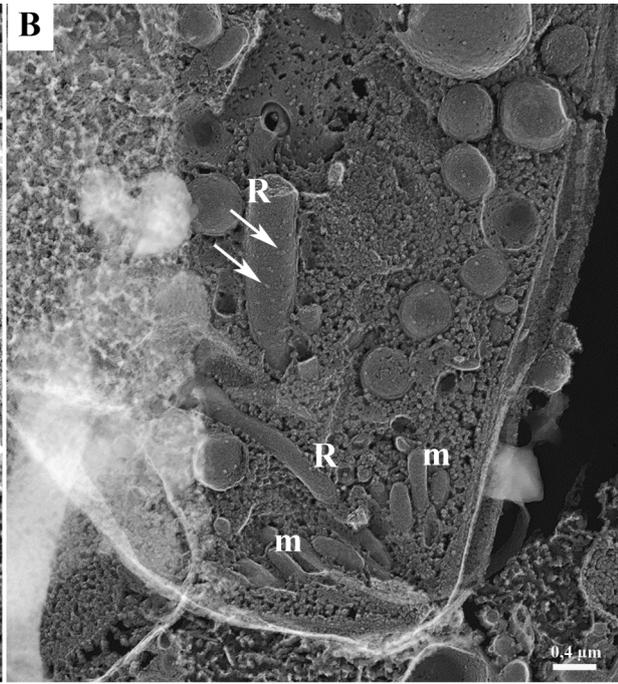
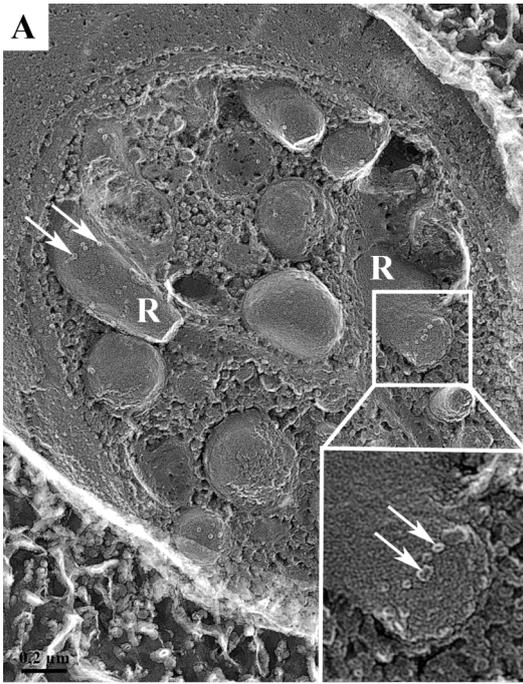


Figura 22 - Réplicas metálicas de bradizoítos em cistos de Me49 isolados de cérebro de camundongo na fase crônica da infecção, que foram criofraturados, seguido de *etching*. **A** - Na parte apical podemos observar micronemas (m) e, assim como nos taquizoítas, apresentando pequenas ligações (cabeça de seta branca) entre eles. **B** - PIs (setas) estão dispostas na superfície das róptrias em fileiras por toda a superfície da organela. **C** - Na parte basal do bulbo podemos observar algumas PIs sem um arranjo definido (cabeça de seta preta).

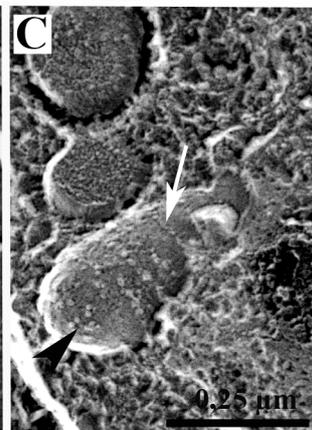
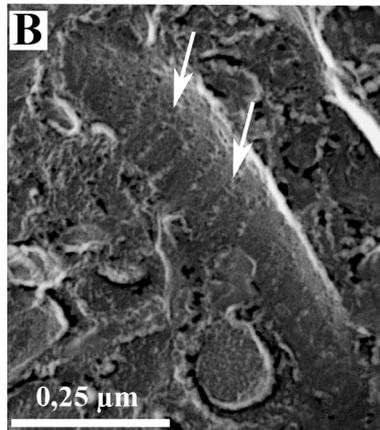
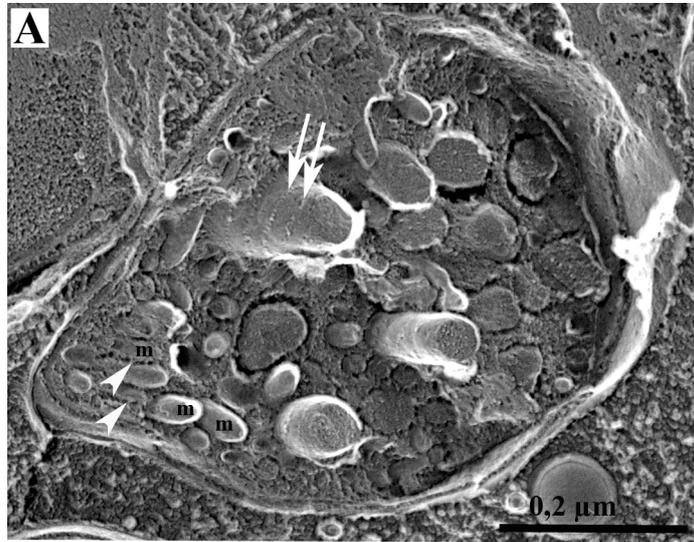
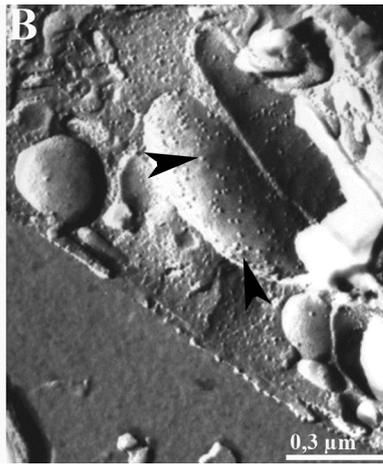
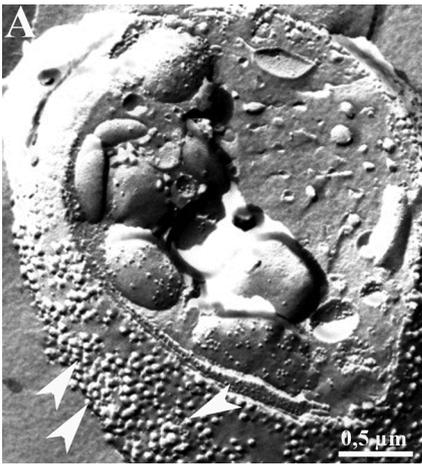


Figura 23 – O antibiótico filipina foi usado no fixador para localizar esteróis nas faces tratadas da membrana da rópria de taquizoítos da cepa RH, processados por criofratura convencional. **A** – A superfície fraturada dos taquizoítos apresentou complexo macromolecular (cabeças de seta brancas), formado pela ligação do antibiótico com o esterol. **B** – A superfície fraturada das róprias não apresentou tais complexos, somente PIs (cabeças de seta pretas).



2.2 – Comparação morfométrica entre taquizoítos e bradizoítos

Realizamos medições do volume relativo ocupado pelas organelas nos bradizoítos (Figura 24A) utilizando cortes ultrafinos de cistos de Me49 isolados (Tabela 3). Os grânulos de amilopectina ocuparam um volume médio de 6,57%, sendo segunda estrutura medida mais abundante no citoplasma dos bradizoítos. A primeira foi o núcleo, com 13,85%. As róptrias ocuparam um volume de 3,66%, um pouco menos que o observado pelos grânulos densos, de 4,85%. Os micronemas ocuparam 2,76% do volume total, um valor próximo do ocupado pela mitocôndria, de 2,1%. Apicoplasto e corpos lipídicos ocuparam volumes relativos bem similares, de 0,32% e 0,34%, respectivamente. O acidocalcissomo ocupou um volume um pouco maior, de 0,42%.

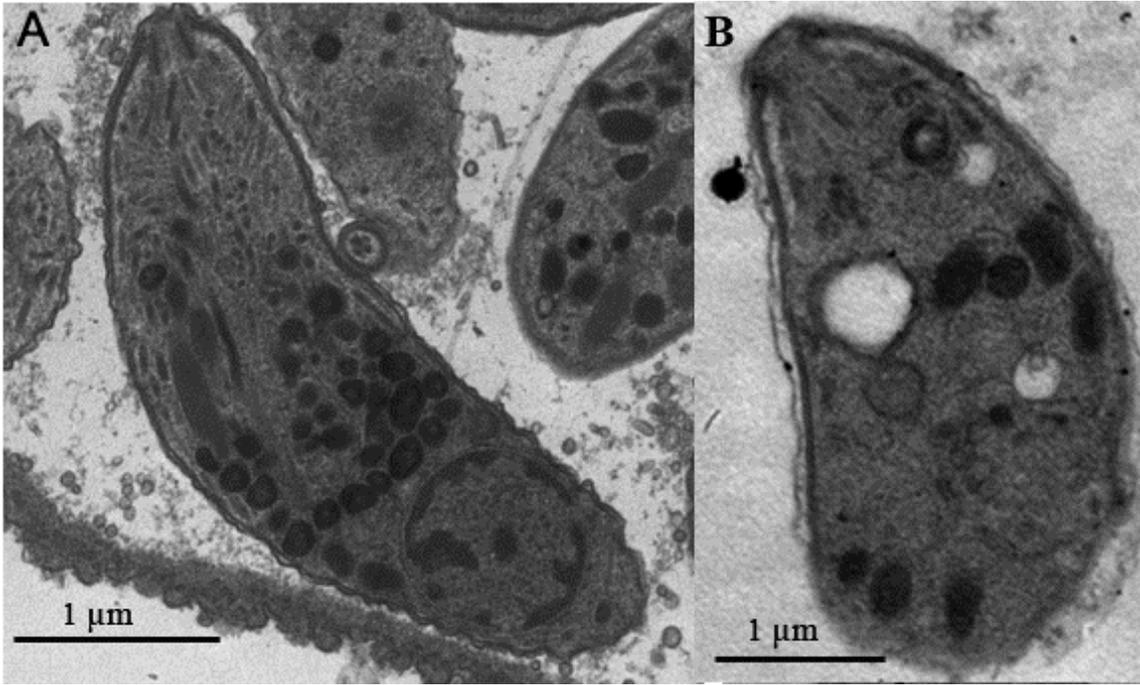
Realizamos a morfometria destas mesmas organelas em taquizoítas de Me49 (Figura 24B) (Tabela 3). O núcleo apresentou volume médio ocupado, de 17,24%, bem semelhante ao bradizoíto. Já as róptrias apresentaram um volume menor, de 2,58%, bem como os grânulos densos, com 1,27% do volume total. O volume médio do apicoplasto em taquizoítos foi o dobro do apresentado em bradizoítas, com 0,65% do volume total. A mitocôndria apresentou um volume ocupado maior, com 3,25%. Os micronemas apresentaram um volume bem menor também, com 0,3% do volume total.

Tabela 3 – Comparação entre taquizoítos e bradizoítos quanto ao volume médio ocupado por algumas organelas em relação ao volume total, a partir de imagens digitais de cortes ultrafinos e analisadas pelo programa iTEM.

<u>Organela</u>	<u>Taquizoíto</u>	<u>Bradizoíto</u>
Apicoplasto	0,65%	0,32%
Acidocalcissomo	2,06%	0,42%
Corpo lipídico	0,01%	0,34%
Grânulo denso	1,27%	4,85%
Grânulo de Amilopectina	<i>nd</i>	6,57%
Micronema	0,3%	2,76%
Mitocôndria	3,25%	2,1%
Núcleo	15,24%	13,85%
Róptria	2,58%	3,66%

nd – não determinado

Figura 24 – Para avaliação do volume ocupado por algumas organelas utilizamos cortes ultrafios das formas taquizoíta e bradizoíta. **A** - Imagem representativa de bradizoítas. **B** - Imagem representativa de taquizoítas.



3 - Encistamento *in vitro*

O primeiro protocolo utilizado para induzir o encistamento do *T. gondii* foi o aumento do pH do meio das células hospedeiras LLC-MK2. Entretanto, nenhum resultado positivo foi obtido. Em seguida, testamos o choque térmico para estimular o encistamento. Para tanto, adaptamos o protocolo descrito por Soête e colaboradores (1994), com a cepa virulenta RH, para a cepa cistogênica Me49. Primeiramente, as células foram deixadas a 42°C durante todo o cultivo. Entretanto, muitas células descolaram da placa de cultivo, enquanto as remanescentes se encontravam sofridas, nos levando a testar outras variações metodológicas.

A incubação prévia das células LLC-MK2 por 30 minutos a 42°C e depois retornando para 37°C, após a infecção com taquizoítos de Me49, apresentou o melhor resultado. O monitoramento da diferenciação foi feito com o uso da lectina DBA, que mostrou marcação positiva 48 horas após o estímulo (Figura 25). Esta marcação foi também observada nas culturas de 72 e 96 horas (Figura 26).

Com a cepa cistogênica EGS e as células LLC-MK2 obtivemos resultados similares. Nem todos os vacúolos se diferenciam em cistos teciduais, permanecendo alguns parasitos na forma taquizoíta dentro de um vacúolo parasitóforo, no arranjo em forma de roseta (Figura 27). Quando utilizamos culturas de fibroblasto humano, 4-5 após a interação observamos cistos de diferentes tamanhos na cultura (Figura 28), sem a necessidade de uso de qualquer agente estressor para a indução do encistamento.

Processamos culturas de LLC-MK2 após 216 horas de interação para microscopia eletrônica de transmissão. Nos cortes ultrafinos deste material, notamos a presença de uma parede cística eletrondensa e espessa circundando os bradizoítos (Figura 29A). Como podemos observar na Figura 29B, uma mesma célula pode abrigar tanto um cisto formado (abrigo poucas unidades de bradizoítos em seu interior)

quanto vacúolos parasitóforos contendo taquizoítos. Os parasitas em diferenciação apresentaram grânulos de amilopectina em seu citoplasma (Figura 29C). Os cistos em formação apresentaram mitocôndrias, perfis de retículo endoplasmático e filamentos de citoesqueleto próximos à parede cística (Figura 30). A parede cística se apresenta formada por material granular, espessa e com vesículas. Na Figura 30C podemos observar uma vesícula grande na matriz do cisto em formação, próxima à parede cística. A membrana, que se localiza justaposta a esta parede, também apresentou reentrâncias como observado em cistos isolados (Figura 30B). Não observamos estruturas tubulovesiculares na matriz, que era preenchida por um material granular (Figura 30A).

Figura 25 – LLC-MK2 infectadas com *Toxoplasma gondii* (cepa Me49) 48 horas após o estímulo térmico para o encistamento. **A** - Vacúolo (seta) marcado positivamente para a lectina DBA-FITC. **B** – Em uma outra célula, vacúolos (seta) marcados positivamente para a lectina DBA-FITC.

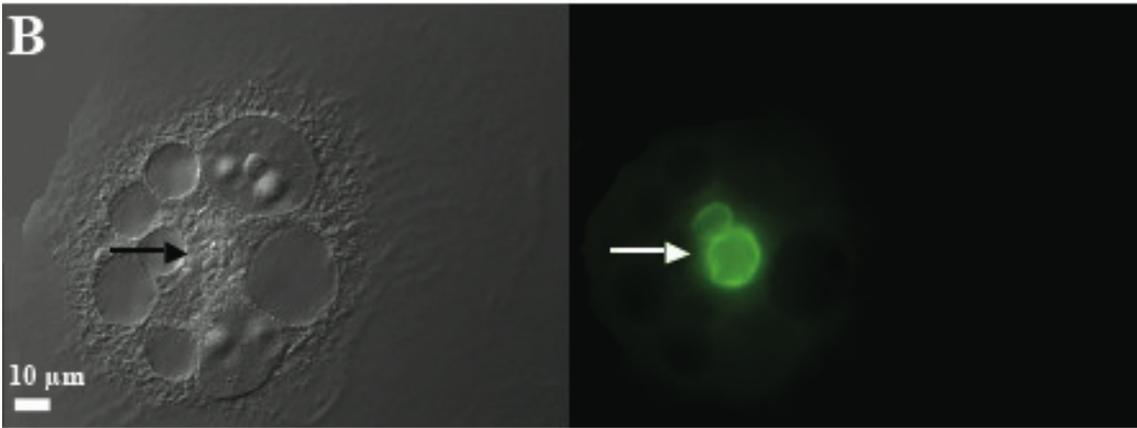
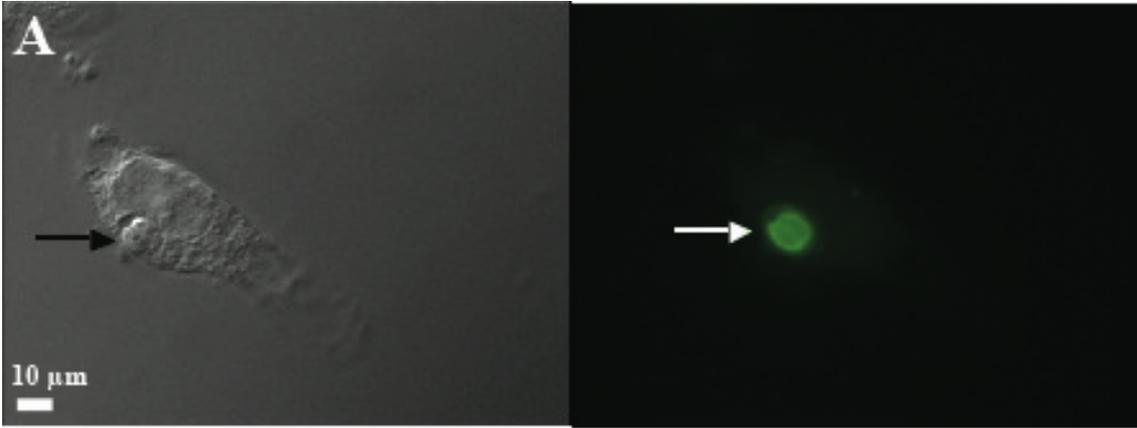


Figura 26 - *Toxoplasma gondii* 72 horas após o estímulo para o encistamento, em culturas de LLC-MK2 (cepa Me49). **A** – Vacúolos (seta) apresentando marcação positiva para a lectina DBA-FITC. **B** – Em uma outra célula, vacúolos apresentando marcação positiva para a lectina DBA-FITC.

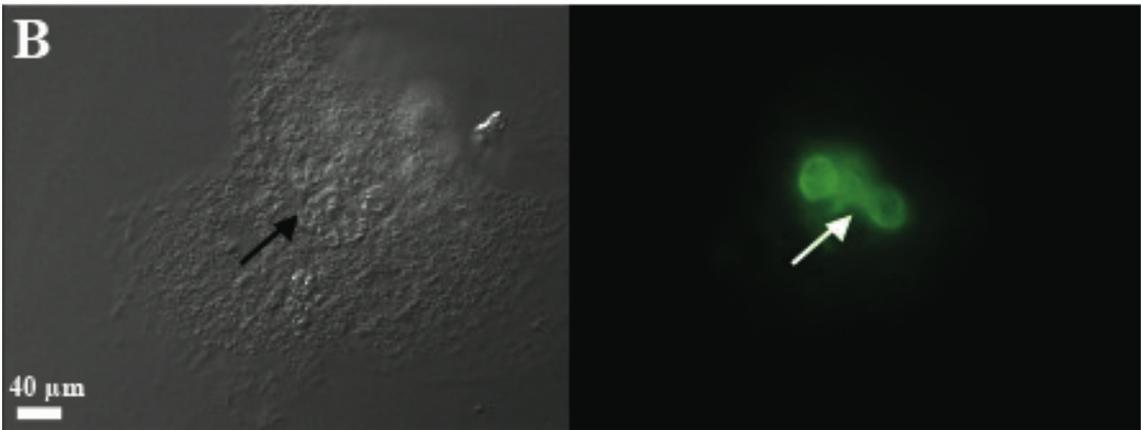
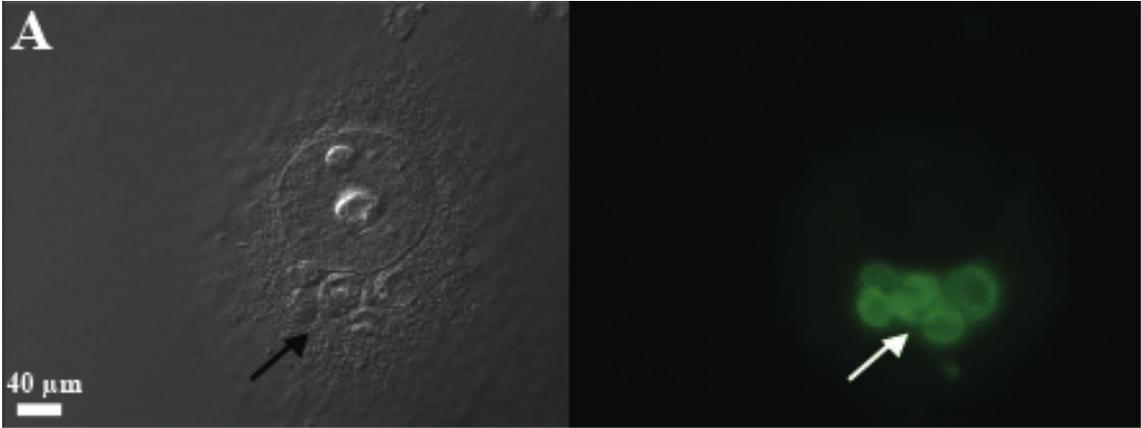


Figura 27 - *Toxoplasma gondii* (cepa EGS) 72 horas após o estímulo para o encistamento, em culturas de LLC-MK2. **A** – Imagem de contraste interferencial mostrando uma célula contendo um vacúolo (seta) em processo de encistamento. **B** – Este vacúolo apresenta marcação positiva para a lectina DBA-FITC (seta). **C** - Imagem de contraste interferencial mostrando células contendo vacúolos parasitóforos (cabeças de seta) e uma célula contendo um vacúolo (seta) em processo de encistamento. **D** – Os vacúolos parasitóforos são negativos para DBA-FITC, enquanto que o vacúolo em processo de encistamento (seta) apresenta marcação positiva.

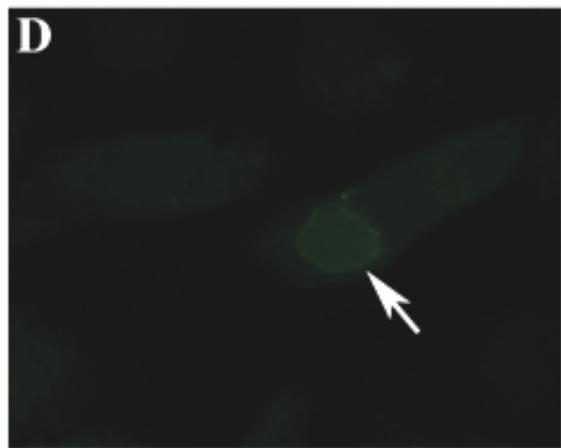
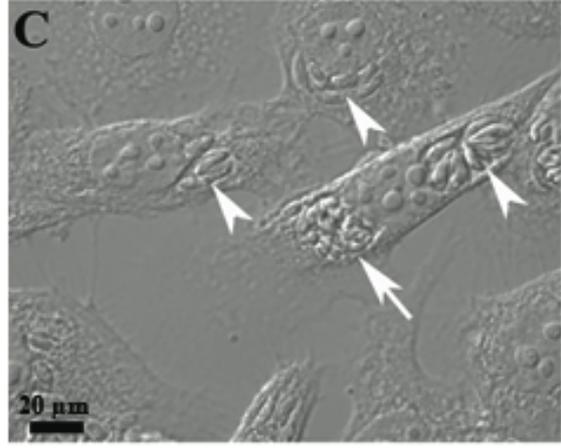


Figura 28 - Culturas de fibroblastos infectadas com *Toxoplasma gondii* (cepa EGS). **A** - Observamos cistos (setas) 4-5 dias após a interação, sem a necessidade de uso de um agente estressor. **B** - Foram observados vários cistos (setas), de diferentes tamanhos, na cultura.

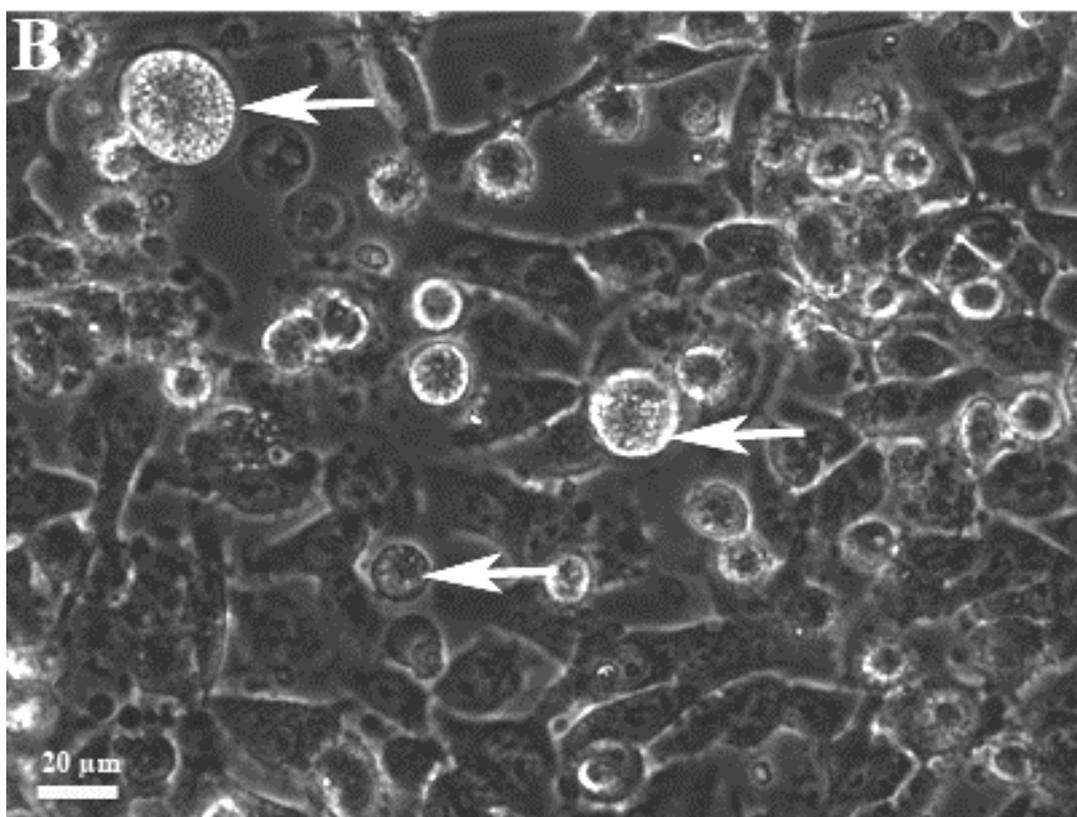
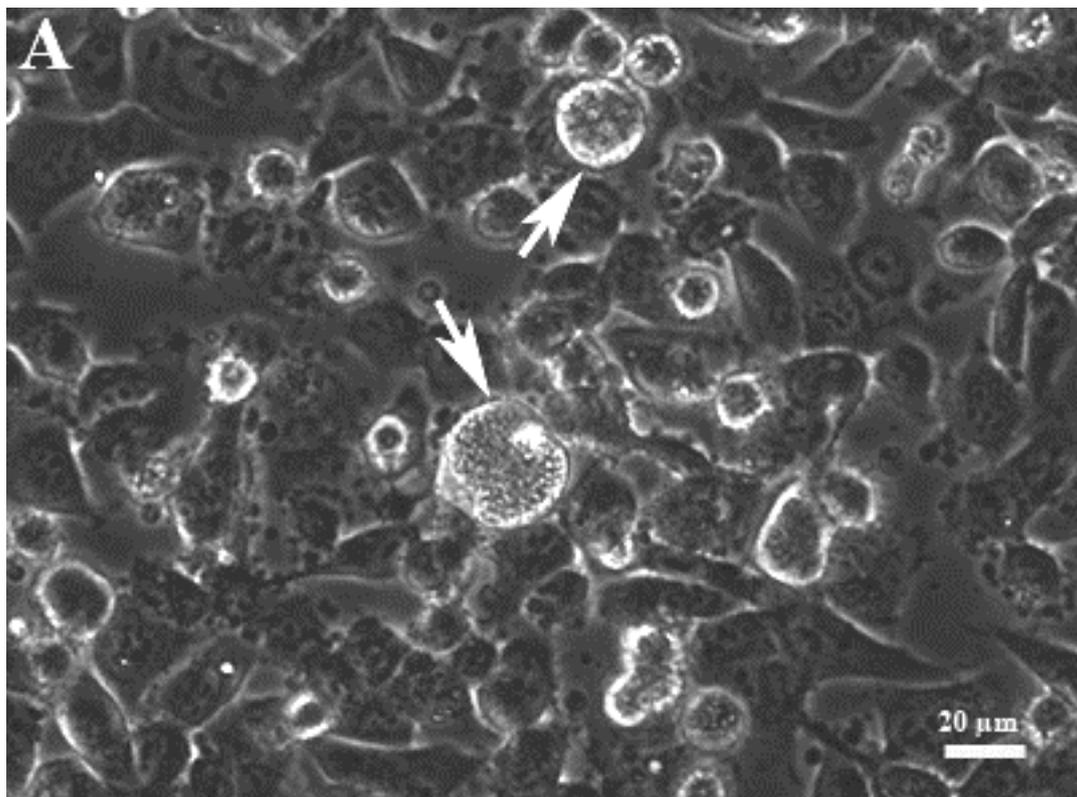


Figura 29 - Cortes ultrafinos de culturas de células LLC-MK2 infectadas com a cepa cistogênica EGS com 216 horas de encistamento. **A e B** – Podemos observar cistos (setas pretas) com formação de uma parede cística. Uma mesma célula pode abrigar cisto e vacúolos que não estão em processo de encistamento (setas brancas). **C** – Observamos grânulos de amilopectina (cabeças de seta) em parasitos durante a diferenciação.

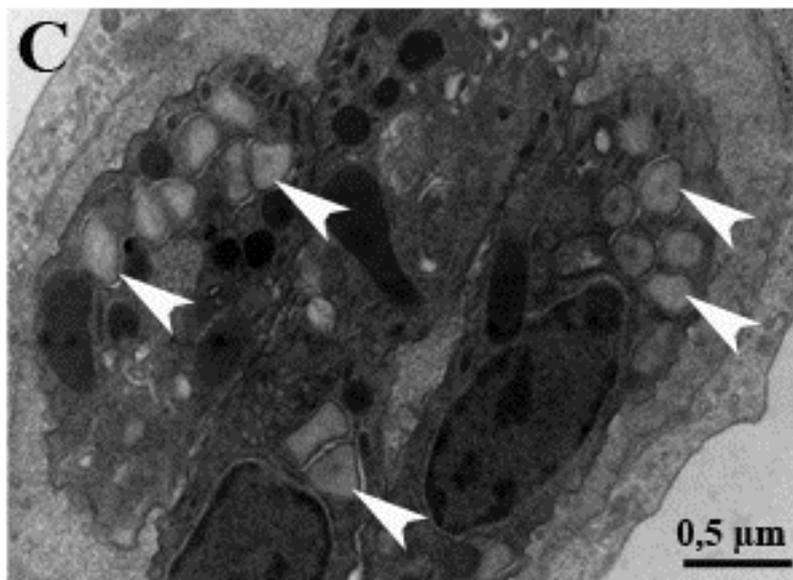
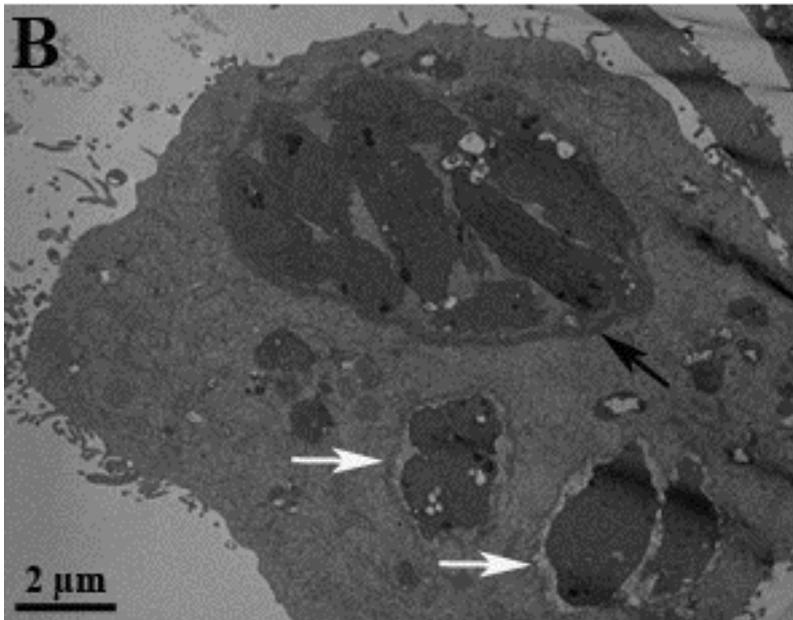
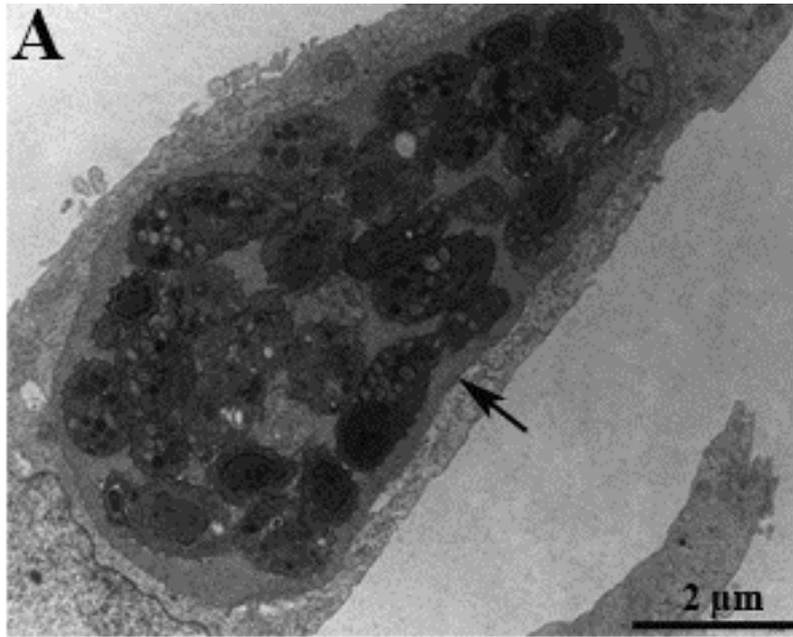
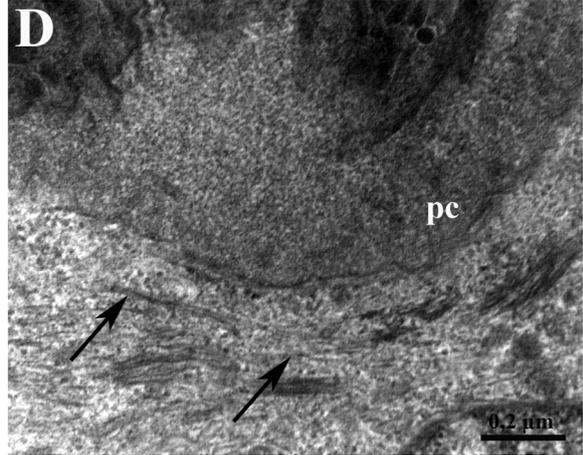
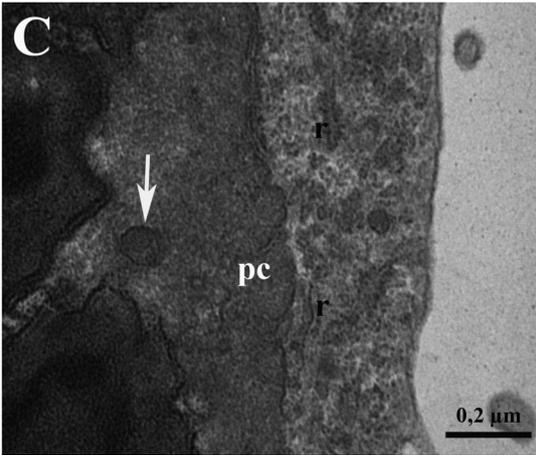
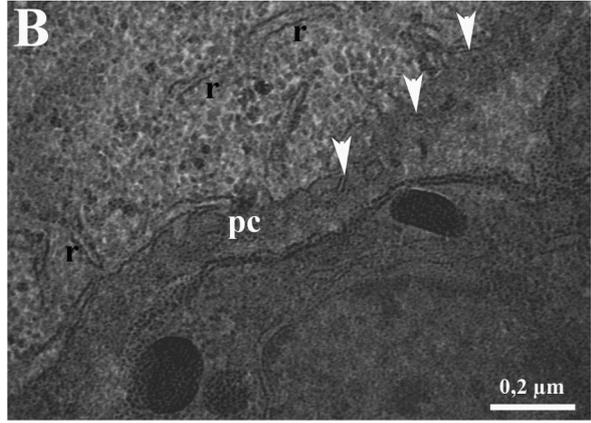
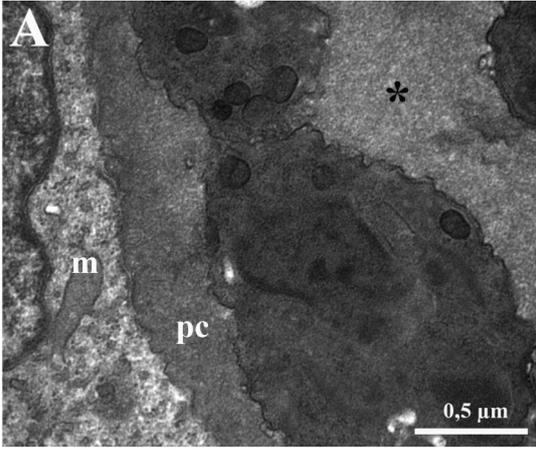


Figura 30 - Cortes ultrafinos de culturas de células LLC-MK2 infectadas com a cepa cistogênica EGS com 216 horas de encistamento. **A** - A parede cística (pc) é espessa como em cistos maduros, sendo formada por um material granular. Mitocôndria (m) é observada próxima à parede. A matriz do cisto em formação apresentou aspecto granular (asterisco). **B** - Perfis de retículo endoplasmático (r) são observados próximos à parede cística (pc). A membrana limitante também apresentou reentrâncias (cabeças de seta). **C** - Podemos observar uma vesícula grande (seta branca) perto da parede cística na matriz. Perfis de retículo endoplasmático (r) da célula hospedeira são também observados. **D** - Elementos de citoesqueleto (setas pretas) foram observados próximos à parede cística (pc).



4 – Genes de quitina sintase e quitinase

Boothroyd e colaboradores em 1997 mostraram que a parede cística era marcada com a lectina WGA, que reconhece resíduos de N-acetil-glicosamina, sugerindo que esta fosse formada por quitina. Entretanto, ao usarmos o fluorocromo Calcofluor, que é comumente usado para marcar quitina, não observamos nenhuma marcação, mesmo quando dobramos a concentração deste fluorocromo. A fim de determinar se poderia ter quitina na parede do cisto de *T. gondii*, utilizamos a plataforma ToxoDB (<http://www.toxodb.org>) para procurarmos as seqüências das enzimas quitina sintase e quitinase. Para tanto usamos as seqüências destas enzimas que já foram caracterizadas em outros organismos, como *Plasmodium* spp, *Entamoeba* e *Leishmania*.

Alinhando as seqüências conhecidas destas enzimas nestes organismos mencionados com o programa BLAST da página do Projeto genoma do *T. gondii*, nenhuma similaridade foi estabelecida. Tentamos, então, alinhar somente o sitio catalítico destas enzimas, que é uma seqüência bastante conservada (Renkema *et al.*, 1995; Tsuboi *et al.*, 2003; Campos-Gangora *et al.*, 2004). Mais uma vez, nenhuma seqüência no genoma do *T. gondii* foi obtida.

Cistos do protozoário oportunista *Acanthamoeba polyphaga* apresentam celulose na sua parede (Linder *et al.*, 2002). Assim, também procuramos pelas seqüências das enzimas celulase e celulose sintase no genoma seqüenciado do *T. gondii*. Entretanto, mais uma vez, não obtivemos nenhum resultado positivo.

Discussão

O cisto tecidual de *Toxoplasma gondii*

A formação do cisto tecidual de *T. gondii* é uma etapa importante no seu ciclo, permitindo o seu escape do sistema imune do hospedeiro e perpetuando a infecção. Os cistos teciduais também têm um papel epidemiológico, pois permitem a transmissão entre hospedeiros intermediários ou de um hospedeiro intermediário para o definitivo. A caracterização de sua organização estrutural é um fator essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que possam ser aplicadas para o controle da toxoplasmose.

Um dos maiores desafios no desenvolvimento de novos compostos terapêuticos com atividade contra o *T. gondii* é o efetivo acesso destas substâncias ao parasito. Na fase crônica é ainda mais problemático já que os bradizoítos estão protegidos por uma parede cística – estrutura que atua como uma barreira física a estas substâncias. Entretanto, esta organização estrutural ainda não havia sido caracterizada. Com o entendimento da organização dos elementos que formam a parede e o cisto e das diferenças morfológicas e metabólicas entre taquizoítos e bradizoítos, novas moléculas com ação anti-*Toxoplasma* poderão potencialmente ser desenvolvidas.

Enzimas importantes de patógenos, como quitinase, são importantes alvos para desenvolvimento de novos fármacos (Shahabuddin e Kaslow, 1993) e componentes da cápsula de fungos são importantes alvos de desenvolvimento de fármacos e vacinas em fungos (Zaragoza *et al*, 2009). Estes dois dados reforçam a importância de uma caracterização dos componentes que formam a parede do cisto tecidual de *T. gondii*. Trabalhos anteriores caracterizaram um dos componentes da parede cística de *T. gondii*, a glicoproteína denominada CST1, que contém resíduos de N-acetilgalactosamina e que

se liga à lectina de *Dolichos biflorans* (DBA). Esta glicoproteína além de quitina e outros glicoconjugados se organizariam formando a parede cística (Boothroyd *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001). Entretanto, não observamos marcação na parede do cisto ao incubarmos cistos de Me49 isolados de cérebros de camundongos na fase crônica da infecção com o fluorocromo Calcofluor. Este fluorocromo é usado como marcador de quitina em paredes de fungos (Gonçalves *et al.*, 2006). Adicionalmente, não encontramos nenhuma seqüência no genoma de *T. gondii* (ToxoDB) para quitina sintase (enzima que sintetiza quitina) nem para quitinase (enzima que degrada quitina), mesmo quando usamos a seqüência inteira das proteínas ou quando usamos somente a seqüência do sitio catalítico. A lectina WGA pode se ligar também a ácido siálico, além de GlcNac, assim a sugestão da presença de quitina na parede, baseada na marcação observada por Boothroyd e colaboradores (1997), foi errônea.

Curiosamente, o protozoário oportunista *Acanthamoeba polyphaga* apresenta como componente de sua parede cística a celulose (Neff e Benton, 1962). Uma vez que não encontramos seqüência para quitina sintase no genoma do *T. gondii*, procuramos também pelas seqüências de celulase e celulose sintase. Entretanto, mais uma vez não obtivemos nenhum resultado positivo.

Nesta tese utilizamos em sua maior parte cistos da cepa Me49 isolados de cérebros de camundongos na fase crônica da infecção. Esta cepa foi utilizada para este estudo, pois produz um número significativo de cistos por camundongo na fase crônica da infecção, além de ser de fácil manutenção.

Dúvidas poderiam ser levantadas quanto aos danos que o processo de isolamento do cisto de *T. gondii* poderia levar à estrutura da parede do cisto. Entretanto, fragmentos de cérebro infectado foram congelados e a estrutura da parede cística analisada,

mostrando que o processo de isolamento do cisto não traz nenhuma alteração à sua conformação, validando os resultados obtidos com cistos isolados.

Ao analisar os cistos isolados de cérebros de camundongos na fase crônica da infecção, observamos que os elementos que formam a parede cística encontravam-se nos dois lados da membrana que circunda o cisto, contrariando descrições prévias de que a parte granular da parede seria acumulada somente abaixo da membrana (Pavesio *et al.*, 1992). Caso a caracterização tivesse sido feita somente por cortes ultrafinos de cistos isolados de cérebro, poderíamos estar analisando os cortes em diferentes planos o que nos levaria a conclusões imprecisas. Entretanto, tanto em cistos isolados quanto em fragmentos de cérebros na fase crônica da infecção que foram fraturados à baixa temperatura, observamos na superfície verdadeira dos cistos os filamentos da parede cística entrelaçados e não uma membrana circundando a parte externa do cisto. Ao secretar elementos que irão formar a parede também na face externa da membrana, o *T. gondii* poderia promover um maior isolamento do citoplasma da célula hospedeira, e ao mesmo tempo, conferir maior proteção aos bradizoítas.

Nossos resultados mostraram os componentes da parede cística de *T. gondii* formando uma rede intrincada, dividida em duas partes: uma mais externa, bem compacta; e uma mais interna, voltada para a matriz do cisto, apresentando uma trama mais frouxa e um aspecto de esponja. Este arranjo da parede cística poderia estar atuando não somente como uma barreira física, mas ao mesmo tempo permitiria uma incorporação mais fácil de pequenas moléculas da célula hospedeira. Esta incorporação poderia ocorrer pelos poros que observamos na superfície da parede cística, semelhante aos encontrados na membrana do vacúolo parasitóforo na fase aguda da infecção (Schwab *et al.*, 1994; Lemgruber *et al.*, 2008).

Túbulos e vesículas inseridos na parede cística também foram observados como mencionado previamente por Guimarães *et al.* (2007). O papel funcional destas estruturas é ainda desconhecido. Podemos inferir que elas tenham função na captação de metabólitos da célula hospedeira ou no transporte de material dos bradizoítos para a parede cística, através de vesículas observadas na matriz cística adjacentes à parede. Os túbulos poderiam ser invaginações da membrana que envolve o cisto, que é bem irregular e convoluta, com extensões que penetram no interior da parede cística, como foi bem visualizado no nosso material processado com a técnica de ósmio-imidazol. Esta parede, apesar de ser rígida e espessa, é uma estrutura permeável a pequenas moléculas, uma vez que o fluoróforo Lucifer Yellow (457 Da de peso molecular) conseguiu atravessar esta estrutura, acumulando-se na matriz do cisto. Guimarães e co-autores (2007) caracterizando a carga elétrica de cistos de *T. gondii* isolados, empregando ferritina cationizada e vermelho de rutênio, revelaram a natureza da superfície dos cistos e o transporte de ferritina em vesículas e túbulos na matriz do cisto e na região granular, corroborando nossas observações que a parede é uma estrutura permeável.

Outros eucariotos apresentam uma parede celular, como os fungos. A parede celular nos fungos é uma estrutura rígida, que confere resistência às variações do meio onde o fungo se encontra, bem como às respostas do sistema imune dos hospedeiros (Lipke e Ovalle, 1998). Esta parede, entretanto, também precisa ser permeável a pequenas moléculas, para que o fungo possa adquirir nutrientes. Curiosamente, foram descritos, por microscopia de força atômica, poros de aproximadamente 200 nm na parede de *Saccharomyces cerevisiae* (de Souza Pereira e Geibel, 1999). Este tamanho é bem próximo ao dos poros observados por microscopia eletrônica de varredura na superfície da parede dos cistos isolados de *T. gondii*, que poderiam ser responsáveis pela

sua permeabilidade. Entretanto, as funções fisiológicas dos poros observados na parede celular tanto de fungos quanto em cistos de *T. gondii* requerem maiores estudos.

Observamos grandes vesículas na matriz cística, com diâmetro médio de 512 nm. Estas vesículas poderiam ter papel no transporte dos componentes para a parede cística, já que o lúmen destas vesículas era preenchido por um material granuloso, eletrondenso, com aspecto similar ao do material que forma a parede dos cistos. Este conteúdo é composto por glicoconjugados, como revelado quando cistos isolados foram processados pela técnica de Thiéry (1967). Estas vesículas seriam secretadas pelos bradizoítos e, posteriormente, quando próximas da parede, liberariam seu conteúdo. Uma hipótese proposta é a de que esta liberação poderia ocorrer pela atuação de lipases, que romperiam a membrana e o conteúdo seria então depositado na parede do cisto, como tem sido proposto no caso de fungos (Chen *et al.*, 1997).

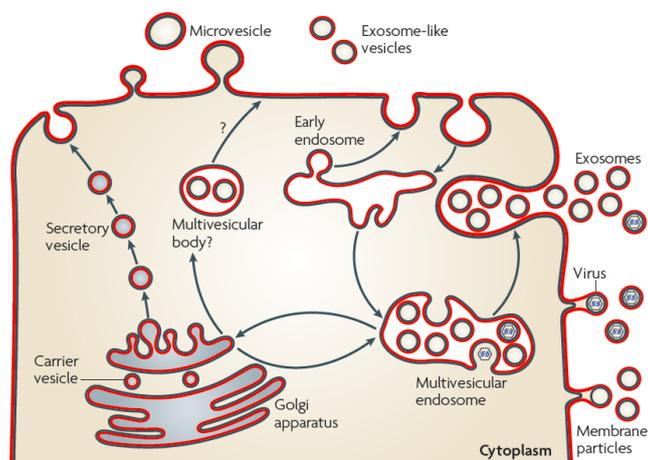
O mecanismo que estas vesículas utilizam para atravessar a parede e se fundir à membrana que circunda o cisto, liberando o seu conteúdo do lado externo para formação da estrutura propriamente dita, a parede cística, merece ser ainda investigado. Podemos, entretanto, basear nossa hipótese analisando um outro eucarioto que também apresenta uma parede, e, como no caso do *T. gondii*, precisa atravessar vesículas pela sua parede. É o caso dos fungos, onde o modelo mais estudado é o *Cryptococcus neoformans*. Os polissacarídeos que formam a parede dos fungos são sintetizados no citoplasma do fungo e posteriormente exocitado por vesículas que atravessam a parede (Yoneda e Doering, 2006; Rodrigues *et al.*, 2007). Estas vesículas contêm também lipídeos e proteínas (Rodrigues *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2008) e apresentam diâmetros que variam de 60 a 300 nm (Rodrigues *et al.*, 2007), bem semelhantes às vesículas observadas na matriz e na parede do cisto de *T. gondii*. Como no caso do *T. gondii*, a questão de como tais vesículas nos fungos conseguem atravessar a parede é

ainda incerta, bem como a questão de como são carregadas através desta estrutura (Nosanchuk *et al.*, 2008; Casadeval *et al.*, 2009). Estes dados nos mostram como diferentes organismos podem usar de mecanismos análogos para superar problemas comuns.

Algumas das grandes vesículas observadas na matriz do cisto de *T. gondii* apresentaram um conteúdo lipídico, como observado em preparações de cistos isolados pela técnica de ósmio-imidazol. Isso poderia ser uma sugestão de que a captação de lipídeos da célula hospedeira pelo parasito continua durante o encistamento. Esta suposição é respaldada pelo fato de mitocôndrias da célula hospedeira se encontrarem associadas ao cisto durante o encistamento (Lindsay *et al.*, 1993).

Em réplicas metálicas de cistos isolados de cérebros que foram criofraturados, seguido de *etching*, observamos os bradizoítos secretando vesículas pela sua porção posterior, tanto por brotamento como por liberação de vesículas na matriz. O brotamento destas vesículas se assemelha ao que ocorre na formação de microvesículas na membrana de células eucarióticas como observado no esquema 7 (revisto em Théry *et al.*, 2009). Estas microvesículas, com diâmetro maior que 100 nm, brotam da membrana de células, como células dendríticas e neutrófilos. Esta liberação de vesículas em membranas também é observada no protozoário *Trypanosoma cruzi* na sua forma tripomastigota, como forma de escape do sistema imune do hospedeiro (Gonçalves *et al.*, 1991; Ouaiissi *et al.*, 1992; Troccoli Torrecilhas *et al.*, 2009). Já a liberação de vesículas pelo bradizoíto de *T. gondii* se assemelha ao processo de secreção de exossomas (revisto em Théry *et al.*, 2009). Estas estruturas são corpos intracelulares que contém vesículas de origem endossomal em seu interior, que são liberadas no meio extracelular quando estes corpos se fusionam com a membrana plasmática.

Com base nos dados da literatura e com os dados obtidos por nós, montamos um esquema mostrando as principais etapas da formação da parede cística, que é apresentado na Figura 31.



Esquema 7 – Diferentes tipos de secreção de vesículas observadas nas células de mamíferos. (Retirado de Théry *et al.*, 2009).

Estudos anteriores caracterizaram a matriz do cisto como sendo composta somente por material granular, semelhante ao que forma a parede cística (Pavesio *et al.*, 1992; revisto em Weiss e Kim, 2000), que preencheria o espaço entre os bradizoítos. Entretanto, observamos túbulos e vesículas de diferentes tamanhos na matriz de cistos isolados tanto por cortes ultrafinos, quanto por preparações de criofratura, seguido de *etching*, semelhantes às estruturas reportadas por Guimarães e colaboradores (2007). Estes túbulos apresentaram dimensões semelhantes ao dos elementos da rede intravacuolar, observada no vacúolo parasitóforo na fase aguda da infecção (Mercier *et al.*, 2002; Magno *et al.*, 2006; Lemgruber *et al.*, 2008).

A rede intravacuolar se estende por todo o lúmen do vacúolo parasitóforo, conectando os taquizoítos uns aos outros e à membrana do vacúolo, ordenando os parasitos dentro do vacúolo e permitindo uma divisão sincronizada destes (Magno *et al.*, 2005; Lemgruber *et al.*, 2008). Durante o desenvolvimento dos taquizoítas no vacúolo

parasitóforo, os grânulos densos secretam proteínas – as GRA - na matriz do vacúolo (revisto em Mercier *et al.*, 2005). Algumas destas proteínas são inseridas na rede intravacuolar - as GRA 1, 2, 3, 4, 6, 7 e 9; enquanto outras são inseridas na membrana do vacúolo parasitóforo – as GRA 1, 3, 5, 7 e 9. Por imunocitoquímica em crio-cortes e em cortes ultrafinos de cistos isolados incluídos em resina hidrofílica e com o uso de anticorpos que reconhecem as GRAs 1, 3 e 7 observamos marcação tanto nos túbulos quanto nas pequenas vesículas que observamos na matriz de cistos isolados, sugerindo que a rede intravacuolar permanece estruturada durante o encistamento.

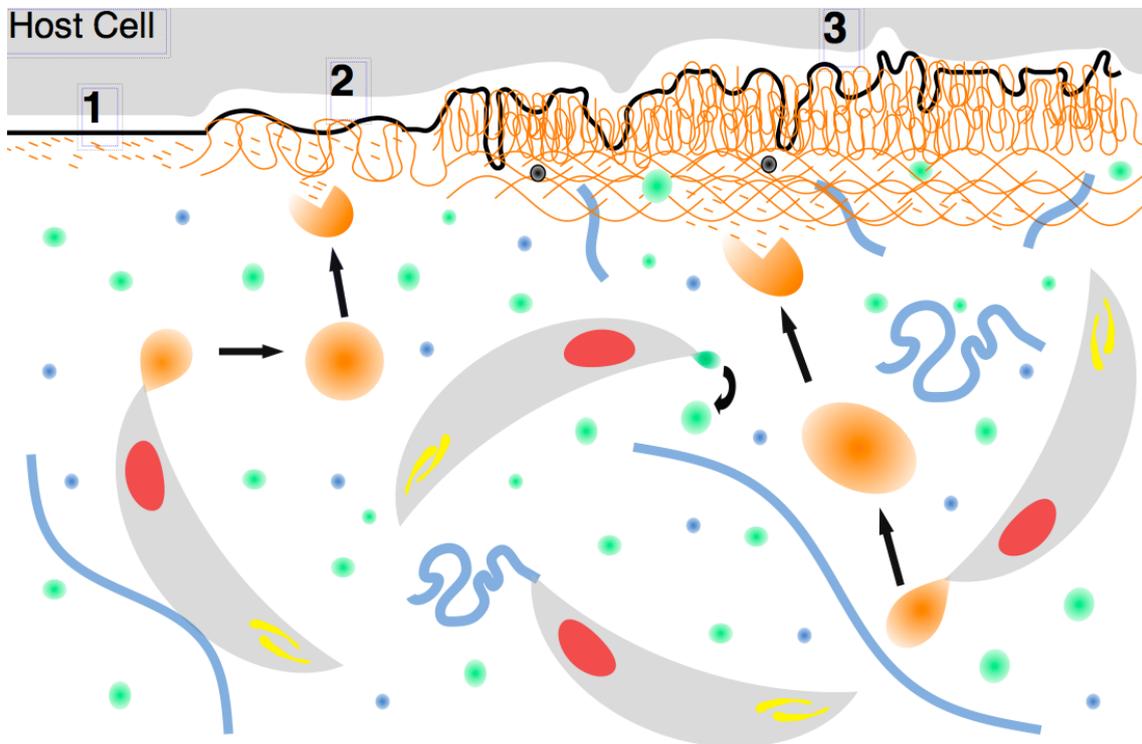
Sibley e colaboradores (1995) caracterizaram a formação desta rede no vacúolo parasitóforo contendo taquizoítas, que ocorre pela secreção de estruturas tubulo-lamelares por uma invaginação na parte posterior do parasito. Estas estruturas, então, se arranjam na rede intravacuolar na matriz do vacúolo. Observamos a mesma invaginação e as mesmas estruturas tubulo-lamelares nos bradizoítos, o que sugere que este aporte de estruturas para a formação de uma rede seja constante durante o encistamento. Os elementos que formariam esta rede foram observados por cortes ultrafinos e em réplicas de material criofraturado seguido de *etching*. Entretanto, ainda não podíamos afirmar que estes elementos estavam organizados numa rede na matriz do cisto.

O uso de um feixe de íons concentrado (FIB) para desbastar material vem sendo utilizado há algum tempo para determinar a organização tridimensional de nano e microestruturas de metais e semicondutores (Inkson *et al.*, 2001; Kammer *et al.*, 2005). Recentemente, esta técnica vem sendo gradualmente utilizada no estudo de organizações tridimensionais de materiais biológicos (de Winter *et al.*, 2009; Schroeder-Reiter *et al.*, 2009; Hekking *et al.*, 2009; Heymann *et al.*, 2009), onde o feixe de íons é utilizado para desbastar o material, que é, em seguida, observado por microscopia

eletrônica de varredura de alta resolução. Assim, utilizamos o FIB para desbastar a parede do cisto, permitindo a observação da matriz. Com esta técnica, enfim, pudemos afirmar que os túbulos encontrados na matriz do cisto estão organizados em uma rede, denominada pelo nosso grupo de intracística, conectando os bradizoítas uns aos outros, e os conectando à parede. Apesar da presença desta rede na matriz do cisto, os bradizoítas não apresentam uma distribuição ordenada como observado no vacúolo parasitóforo.

A matriz do cisto de *T. gondii* apresentou um material amorfo e eletrondenso, distribuído por toda a matriz. Parmley e colaboradores (1994) caracterizaram um antígeno na matriz do cisto, denominado de MAG-1. Este antígeno poderia ser este material filamentososo aqui observado. Este antígeno também é encontrado na matriz do vacúolo parasitóforo durante a fase aguda da infecção. Entretanto, até agora nenhum material filamentososo foi caracterizado estando presente na matriz do vacúolo. A função deste material filamentososo no cisto tecidual é ainda desconhecida.

Figura 31 – Esquema dos principais eventos da formação da parede do cisto de *Toxoplasma gondii*. A primeira etapa é a secreção de vesículas contendo componentes da parede cística (laranja). Estas vesículas ao serem secretadas pelos bradizoítas na matriz são transportadas até a membrana (seta preta) que envolve estas formas, onde liberam seu conteúdo. Posteriormente, na segunda etapa, estes componentes se arranjam em estruturas filamentosas e a membrana aparece no início do processo de se invaginar. Em seguida, na terceira etapa, ocorre o espessamento da parede e a formação de duas camadas: uma mais compacta, a mais externa; e uma mais frouxa, voltada para a matriz. Os elementos da matriz do cisto também estão representados: elementos da rede intracística estão em azul; pequenas vesículas estão em verde.



Diferenças morfométricas

Comparando o volume ocupado por algumas organelas tanto em taquizoítos quanto em bradizoítos, observamos algumas diferenças interessantes. Quando analisamos cortes ultrafinos de bradizoítos, notamos a grande quantidade de micronemas no seu pólo apical, como reportado anteriormente (revisto em Dubey *et al.*, 1998), com esta organela ocupando um volume maior que em taquizoítas – 2,76% do volume em bradizoítos contra 0,3% em taquizoítas.

O significado de bradizoítos apresentarem um número maior de micronemas que em taquizoítas ainda é desconhecido. O conteúdo de micronemas é necessário para a locomoção e interação do taquizoíto com a célula hospedeira (Carruthers e Tomley, 2008). Bradizoítos expõem em sua superfície proteínas diferentes das expostas na superfície de taquizoítos, como as SAG2C, SAG2D e a BAG1 (revisto em Blader e Saeij, 2009), que são estocadas nos micronemas. O conteúdo dos micronemas é utilizado para promover o *gliding* deste parasito (Carruthers e Tomley, 2008). Os bradizoítas são formas que permanecem dentro do cisto tecidual, mas que durante o encistamento apresentam uma motilidade constante e mais agitada do que taquizoítas observados dentro dos vacúolos parasitóforos (Dzierszinski *et al.*, 2004). Ao serem liberados dos cistos no estômago de hospedeiros intermediário ou do definitivo, os bradizoítas necessitam atravessar o epitélio intestinal (Barragan e Sibley, 2003). Este aumento do número de micronemas poderia estar relacionado a esta alta movimentação durante o encistamento e a necessidade de migração pelos epitélios durante a infecção.

Grânulos densos são organelas importantes no desenvolvimento intracelular de taquizoítas, cujo conteúdo destas organelas forma a rede intravacuolar na matriz do vacúolo parasitóforo (revisto em Mercier *et al.*, 2005). O volume ocupado por esta organela aumenta consideravelmente nos bradizoítas em relação aos taquizoítas, sendo

quase 4 vezes maior. Nossos dados mostraram que há uma rede de túbulos na matriz do cisto, conectando os bradizoítos entre si e à parede cística. Para estabelecer uma rede no cisto haveria a necessidade de uma secreção contínua dos componentes desta rede, já que o volume da matriz do cisto aumenta conforme o cisto cresce de tamanho, sendo consideravelmente maior que no vacúolo parasitóforo.

Enzimas que participam do metabolismo de *T. gondii* tem diferentes níveis de expressão entre taquizoítos e bradizoítos (Denton *et al.*, 1996; Yang e Parmley, 1995, 1997; Dzierszinski *et al.*, 1999, 2001). É sugerido que bradizoítas não apresentariam cadeia respiratória ou o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) funcionais, tendo dependência do catabolismo dos grânulos de amilopectina (revisto em Weiss e Kim, 2000). Esta diferença pode ser observada no volume ocupado pela mitocôndria. Nossas avaliações mostraram que esta organela ocupa em taquizoítas um volume relativo de 3,21%, semelhante ao volume determinado por reconstrução de cortes seriados por Melo e colaboradores em 2000, que foi de 3,5%. Em bradizoítos, nossas avaliações mostraram que a mitocôndria ocupa 2,1% do volume total, sendo menor que o volume ocupado em taquizoítos.

Outra organela importante no metabolismo do *T. gondii* é o apicoplasto, que tem papel fundamental no metabolismo de lipídeos (Mazumdar *et al.*, 2006). Foi sugerido que a forma bradizoíta seria mais dependente do metabolismo desta organela do que os taquizoítos (Weiss e Kim, 2000). Entretanto, o volume ocupado por esta organela praticamente cai à metade durante o encistamento.

As róptrias

Róptrias, micronemas e os grânulos densos são organelas características do filo Apicomplexa. O conteúdo secretado por estas organelas desempenha papel crucial na infecção pelo *T. gondii*: a adesão à célula hospedeira, formação de junção móvel e o estabelecimento do vacúolo parasitóforo (revisto em Boothroyd e Dubremetz, 2008).

Proteínas a serem secretadas pela róptria foram localizadas em diferentes regiões desta organela, denominadas pescoço e o bulbo (Lebrun *et al.*, 2005). Esta segmentação sugere a existência de diferentes domínios na membrana desta organela, como também no lúmen, provavelmente desempenhando papéis distintos na infecção do *T. gondii*. Interessantemente, as róptrias das formas taquizoíta e bradizoíta apresentaram três regiões distintas, com uma região de eletrondensidade intermediária conectando o pescoço e o bulbo. Provavelmente representando diferenças na composição, concentração ou empacotamento das proteínas e/ou dos lipídios destas organelas.

As proteínas das róptrias foram localizadas no bulbo (proteínas ROP) (Sadak *et al.*, 1988; Saffer *et al.*, 1992) ou no pescoço (proteínas RON) (Bradley *et al.*, 2005), mas nunca foram observadas nas duas regiões ao mesmo tempo. Como ocorre este processo de separação é ainda incerto. Réplicas metálicas de taquizoítas fraturados mostraram a presença de estruturas membranares no lúmen destas organelas. Estas estruturas somente tinham sido observadas por cortes ultrafinos quando o conteúdo da organela tenha sido secretado durante a invasão na célula hospedeira. Tais estruturas poderiam ter um papel na distribuição das proteínas das róptrias.

Observando as réplicas metálicas de taquizoítas fraturados, constatamos a heterogeneidade da superfície tanto do bulbo quanto do pescoço da róptrias em relação ao tamanho e a distribuição das partículas intramembranares (PI). A face P (parte da membrana voltada para o citoplasma) do pescoço apresentou aproximadamente 7 vezes

mas PIs por μm^2 do que a face E (parte da membrana voltada para o lúmen da róptria). A razão para tal fato não está definida. Podemos especular que esta diferença estaria relacionada com a localização diferenciada das proteínas nas róptrias (Lebrun *et al.*, 2005).

Curiosamente, as PIs nas faces E e P das róptrias de taquizoítas estavam distribuídas em fileiras dispostas paralelamente e periodicamente espaçadas uma das outras. A mesma distribuição foi observada na face fraturada das róptrias dos bradizoítos. Em *Plasmodium*, outro membro do filo Apicomplexa, na forma merozoíta, supõe-se que microtúbulos sejam utilizados para carrear micronemas e as róptrias para o pólo apical (Bannister *et al.*, 2000; Baum *et al.*, 2008). Podemos sugerir que o arranjo singular observado na superfície fraturada da róptria possa indicar uma interação específica com o citoesqueleto de microtúbulos do protozoário, tendo um papel importante na localização apical das organelas. Em réplicas metálicas de taquizoítos e bradizoítos criofraturados, sendo posteriormente feito *etching* profundo, observamos finos filamentos conectando os micronemas. Estes filamentos poderiam atuar na organização e localização destas organelas no pólo apical.

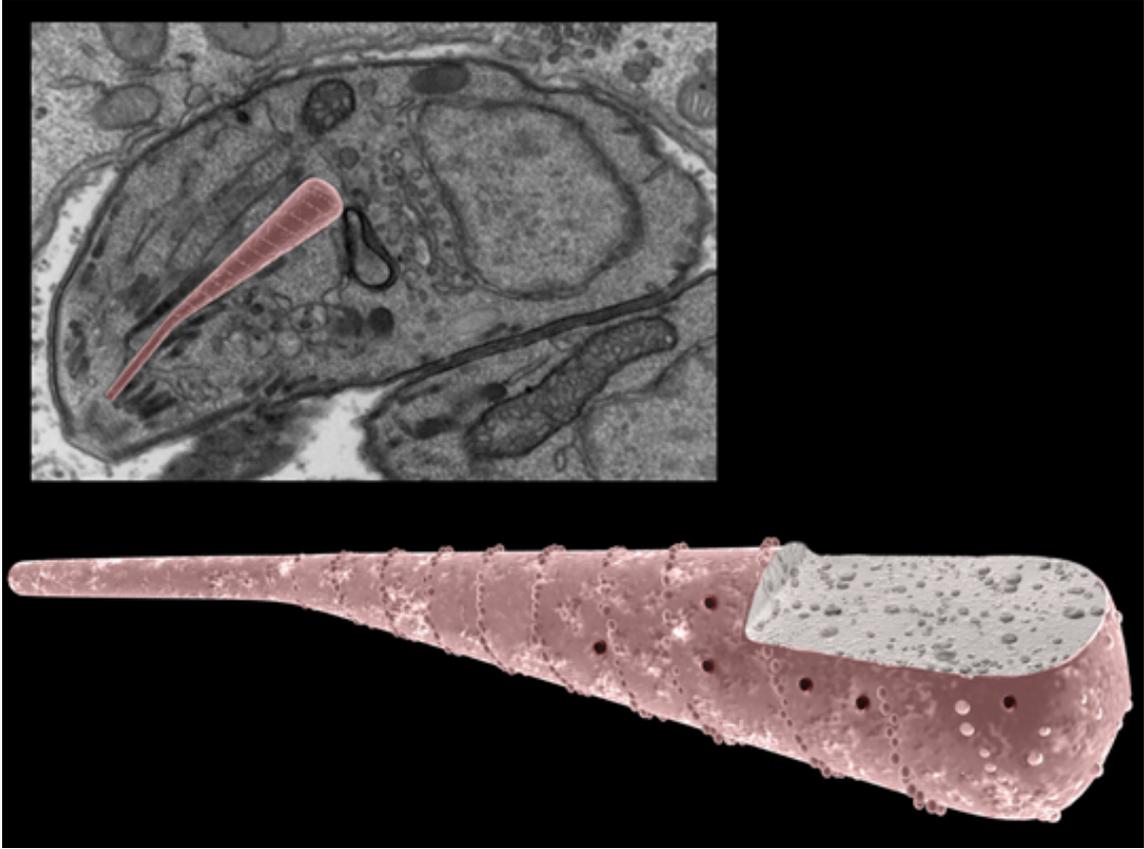
Karasov e colaboradores (2005) caracterizaram um trocador Na^+/H^+ na membrana das róptrias, denominado de TgNHE2. Este trocador é homólogo ao trocador TgNHE1 localizado na membrana plasmática do *T. gondii*, envolvido na regulação de cálcio pelo protozoário (Arrizabalaga e Boothroyd, 2004). O TgNHE2 foi localizado nas róptrias por imunofluorescência, entretanto sem a resolução suficiente para afirmar se no pescoço ou no bulbo desta organela. Nós observamos estruturas semelhantes a poros na membrana do bulbo alinhados em mais de uma fileira. Estes poros observados poderiam ser estes trocadores, envolvidos na internalização de íons H^+ para o interior da organela, acidificando esta porção (Shaw *et al.* 1998).

Próximas a parte apical de taquizoítas e ao pescoço das róptrias de bradizoítas, observamos vesículas por cortes ultrafinos destes materiais. Estas vesículas poderiam se originar de invaginações da membrana da róptria, sendo secretadas durante a exocitose da organela (Ngô *et al.*, 2004). Este processo se assemelharia ao processo de secreção de exossomos (revisto em Théry *et al.*, 2009), e por isso, alguns autores consideram as róptrias organelas semelhantes a corpos multivesiculares que liberariam exossomos (Ngo *et al.*, 2004). Nós observamos estruturas na parte apical do taquizoíta, que poderiam ser vesículas prontas para serem exocitadas no citoplasma da célula hospedeira, que depois se fusionam com o vacúolo parasitóforo ou que são carregadas até o núcleo da célula hospedeira como revisto em Boothroyd e Dubremetz (2008).

Foussard e colaboradores (1991) determinaram que as róptrias são organelas ricas em colesterol, numa proporção colesterol/lipídio de 1,5:1, sendo muito alta para uma membrana estabilizada. Essa composição indicaria que parte do colesterol desta organela poderia estar numa forma cristalina, explicando assim o aspecto lacunar do lúmen desta organela quando observado em cortes ultrafinos (Joiner e Roos, 2002). O antibiótico filipina se liga ao colesterol, assim como 3- β -hidroxiesteróis (Kinsky, 1970; De Kruijff *et al.*, 1974; Norman *et al.*, 1976). Por isso nós o utilizamos para determinar a distribuição do colesterol na face fraturada das róptrias. Entretanto, não foi observado nenhum complexo filipina-colesterol. Não podemos descartar a hipótese de que o antibiótico não teve pleno acesso à organela, nem o fato de que o colesterol na membrana da róptria possa estar em tão baixa quantidade, que não foi suficiente para complexar com o antibiótico.

Compilando nossos dados aqui obtidos e os dados da literatura, um desenho esquemático da róptria foi construído, como mostrado na figura 32.

Figura 32 – Modelo esquemático da rópria de *Toxoplasma gondii*, onde podemos observar os arranjos das partículas intramembranares em fileiras paralelas e os poros na região do bulbo. O lúmen do bulbo também é mostrado, onde podemos observar seu aspecto amorfo. Ao lado, como a rópria está localizada na porção apical em um corte ultrafino do *T. gondii*.



Encistamento *in vitro*

Diferentes tipos celulares vem sendo utilizados para o processo de encistamento *in vitro* de *T. gondii* (Matsubayashi e Akao, 1963; Soete *et al.*, 1994; revisto em Weiss e Kim em 2000 e em Ferreira-da-Silva *et al.* em 2008). A indução deste encistamento *in vitro* se baseia principalmente no uso de um agente causador de estresse, como variação de temperatura, variação do pH do meio ou através de agentes químicos, como citocinas. Entretanto, o uso de tais substâncias podem interferir também nas células hospedeiras, dificultando a determinação de fatores do parasito essenciais para o encistamento.

Recentemente, um grupo brasileiro mostrou que cultura primária de músculo é um ótimo modelo para o estudo de encistamento *in vitro*, uma vez que não há necessidade do uso de um agente causador de estresse (Guimarães *et al.*, 2008; Ferreira-da-Silva *et al.*, 2009a,b). Este modelo, utiliza uma das células em que o *T. gondii* estabelece a cistogênese *in vivo*, reproduzindo assim as condições fisiológicas nas quais o parasito interage com as células de eleição para a manutenção da fase crônica da toxoplasmose, requerendo o sacrificio constante de camundongos para gerar novas culturas. A disponibilidade de linhagens celulares de músculo esquelético é um fator importante que permite inclusive estudos comparativos de sistemas primários e linhagens estabelecidas, favorecendo dessa forma um aprofundamento de entendimento da interação parasito-célula hospedeira mais próximo das condições fisiológicas *in vivo* (revisto em Ferreira-da-Silva *et al.*, 2008).

Os estudos do estabelecimento do encistamento *in vitro* utilizam principalmente cepas do tipo I (como a RH) ou do tipo II (como a Me49) (Soete *et al.*, 1994; Guimarães *et al.*, 2008). Estas cepas são prevalentes na Europa e na América do Norte (Howe e Sibley, 1995). Entretanto, no Brasil o tipo mais comum é o recombinante I/III (Ferreira

et al. 2006). Nós estabelecemos o encistamento *in vitro* para a cepa EGS, cepa brasileira isolada a partir do líquido amniótico humano em Minas Gerais sendo recombinante do tipo I/III (Ferreira *et al.*, 2001; 2006), que poderá ajudar no estudo de drogas para tipos prevalentes no Brasil. Culturas de células infectadas com esta cepa apresentaram tanto cistos em formação quanto vacúolos parasitóforos contendo taquizoítos, mostrando que nem todos os parasitos iniciam o processo de conversão simultaneamente para concluir o encistamento, o que corrobora os ensaios desenvolvidos em outros modelos celulares, incluindo a cepa Me49 que apresenta também essa propriedade (Tomavo *et al.*, 1991; Bohne *et al.*, 1993; Soete *et al.*, 1993, 1994; Weiss *et al.*, 1995; Guimarães *et al.*, 2008; Ferreira-da-Silva *et al.*, 2008, 2009a,b).

Os cistos em formação na fase crônica da infecção uma morfologia semelhante aos dos isolados de cérebros de camundongos infectados, como uma parede cística espessa e eletrondensa. Organelas da célula hospedeira, como mitocôndrias e retículo endoplasmático, e elementos de citoesqueleto, semelhantes a filamentos intermediários, foram observados envolta destes cistos em formação, como já foi observado em outras culturas de células (Lindsay *et al.*, 1993; Halonen *et al.*, 1998; Guimarães *et al.*, 2008), mostrando que é uma característica comum neste processo, independentemente da célula em que ocorre.

Em conclusão, a formação da parede cística e como ocorre a modificação da matriz do vacúolo parasitóforo para o estabelecimento do cisto tecidual poderão ser determinadas por observação de cortes ultrafinos de diferentes etapas do processo de encistamento *in vitro*. Além disso, permitirá uma análise bioquímica da parede cística, determinando os elementos que formam esta estrutura e a análise das vesículas presentes na matriz. O estabelecimento de tal processo em laboratório poderá permitir a avaliação de novos fármacos com atividade anti-*T. gondii* para a fase crônica, antes de

testes *in vivo*, diminuindo o número de camundongos necessários aos testes e permitindo uma análise dos efeitos na estrutura do cisto.

Considerações Finais

Os resultados obtidos na presente tese permitiram a elaboração de 2 artigos científicos:

- 1- “New details on the fine structure of the rhoptry of *Toxoplasma gondii*” Leandro Lemgruber; Pietro Lupetti; Wanderley De Souza; Rossiane C. Vommaro. Submetido para a revista FEMS Microbiology Letters.
- 2- “The array of the cyst wall filaments and the organization of the cyst matrix of *Toxoplasma gondii*”. Leandro Lemgruber, Pietro Lupetti, Wanderley De Souza¹, Rossiane C. Vommaro. Submetido para a revista Protist.

Conclusões

- O processo de isolamento de cisto de *T. gondii* usado neste trabalho não interfere com a estrutura da parede cística;
- O material filamentososo, granular da parede cística se deposita acima e abaixo da membrana convoluta formando a parede cística.
- A parede do cisto de *T. gondii* está dividida em 2 regiões: uma mais compacta, voltada para o citoplasma da célula hospedeira; e uma mais frouxa, voltada para a matriz do cisto, apresentando túbulos e vesículas e é permeável a pequenos solutos;
- O material que forma a parede do cisto de *T. gondii* é provavelmente carregado até a parede por grandes vesículas;
- Uma rede tubular conspícua na matriz do cisto conectando os bradizoítas uns aos outros e à parede do cisto de *T. gondii* foi demonstrada pela primeira vez.
- As partículas intramembranares nas faces da membrana das rôptrias de bradizoítos e de taquizoítos de *T. gondii* estão distribuídas em fileiras paralelas que circundam a organela;
- Poros estão presentes no bulbo das rôptrias de *T. gondii*;
- Micronemas de taquizoítos e bradizoítos são interconectados por finos filamentos;
- Algumas organelas, como mitocôndria, apicoplasto e acidocalcissomo, ocupam um volume menor e outras, como micronemas e grânulos densos, ocupam um volume maior quando se compara taquizoítos com bradizoítos;
- A cepa EGS não necessita de estímulo para encistar *in vitro*.

Referências

ANGERMÜLLER S, FAHIMI HD. Imidazole-buffered osmium-tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. **Histochem J**, v. 14, p. 823-835, 1982.

ARAMINI JJ, STEPHEN C, DUBEY JP. *Toxoplasma gondii* in Vancouver Island cougars (*Felis concolor vancouverensis*): serology and oocyst shedding. **J Parasitol**, v. 84, p. 438-440. 1998.

ARAMINI JJ, STEPHEN C, DUBEY JP, ENGELSOFT C, SCHWANTJE H, RIBBLE CS. Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Epidemiol Infect**, v. 122, p. 305-315, 1999.

ARRIZABALAGA G, RUIZ F, MORENO S, BOOTHROYD JC. Ionophore-resistant mutant of *Toxoplasma gondii* reveals involvement of a sodium/hydrogen exchanger in calcium regulation. **J Cell Biol**, v. 165, p. 653-662, 2004.

BAHIA-OLIVEIRA LM, JONES JL, AZEVEDO-SILVA J, ALVES CC, ORÉFICE F, ADDISS DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 9, p. 55-62, 2003.

BANNISTER LH, HOPKINS JM, FOWLER RE, KRISHNA S, MITCHELL GH. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. **Parasitol Today**, v. 16, p. 427-433, 2000.

BAUM J, GILBERGER TW, FRISCHKNECHT F, MEISSNER M. Host-cell invasion by malaria parasites: insights from *Plasmodium* and *Toxoplasma*. **Trends Parasitol**, v. 24, p. 557-563, 2008.

BARRAGAN A, SIBLEY LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends Microbiol**, v. 11, p. 426-430, 2003.

BECKERS CJ, DUBREMETZ JF, MERCEREAU-PUIJALON O, JOINER KA. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. **J Cell Biol**, v. 127, p. 947-961, 1994.

BISHOP JR, ESKO JD. The elusive role of heparan sulfate in *Toxoplasma gondii* infection. **Mol Biochem Parasitol**, v. 139, p. 267-269, 2005.

BLADER IJ, SAEIJ JP. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS**, v. 117, p. 458-476, 2009.

BOHNE W, HEESEMANN J, GROSS U. Coexistence of heterogeneous populations of *Toxoplasma gondii* parasites within parasitophorous vacuoles of murine macrophages as revealed by a bradyzoite-specific monoclonal antibody. **Parasitol Res**, v. 79, p. 485-487, 1993.

BOHNE W, HEESEMANN J, GROSS U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. **Infect Immun**, v. 62, p. 1761-1767, 1994.

BOOTHROYD JC, DUBREMETZ JF. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, p. 79-88, 2008.

BOOTHROYD JC, BLACK M, BONNEFOY S, HEHL A, KNOLL LJ, MANGER ID, ORTEGA-BARRIA E, TOMAVO S. Genetic and biochemical analysis of development in *Toxoplasma gondii*. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 29, p. 1347-1354, 1997.

BRADLEY PJ, WARD C, CHENG SJ, ALEXANDER DL, COLLER S, COOMBS GH, DUNN JD, FERGUSON DJ, SANDERSON SJ, WASTLING JM, BOOTHROYD JC. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. **J Biol Chem**, v. 280, p. 34245-34258, 2005.

BRANTON D, BULLIVANT S, GILULA NB, KARNOVSKY MJ, MOOR H, MÜHLETHALER K, NORTHCOTE DH, PACKER L, SATIR B, SATIR P, SPETH V, STAEHLIN LA, STEERE RL, WEINSTEIN RS. Freeze-etching nomenclature. **Science**, v. 190, p. 54-56, 1975.

BREINICH MS, FERGUSON DJ, FOTH BJ, VAN DOOREN GG, LEBRUN M, QUON DV, STRIEPEN B, BRADLEY PJ, FRISCHKNECHT F, CARRUTHERS VB, MEISSNER M. A dynamin is required for the biogenesis of secretory organelles in *Toxoplasma gondii*. **Curr Biol**, v. 19, p. 277-286, 2009.

CAMPBELL AL, GOLDBERG CL, MAGID MS, GONDOLESI G, RUMBO C, HEROLD BC. First case of toxoplasmosis following small bowel transplantation and systematic review of tissue-invasion toxoplasmosis following noncardiac solid organ transplantation. **Transpl**, v. 81 p. 408-417, 2006.

CAMPOS-GÓNGORA E, EBERT F, WILLHOEFT U, SAID-FERNÁNDEZ S, TANNICH E. Characterization of chitin synthases from *Entamoeba*. **Protist**, v.155, p. 323-330, 2004.

CARRUTHERS V, BOOTHROYD JC. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, p. 83-89, 2007.

CARRUTHERS VB, TOMLEY FM. Microneme proteins in apicomplexans. **Subcell Biochem**, v. 47, p. 33-45, 2008.

CARRUTHERS VB, HÅKANSSON S, GIDDINGS OK, SIBLEY LD. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. **Infect Immun**, v. 68, p. 4005-4011, 2000.

CASADEVALL A, NOSANCHUK JD, WILLIAMSON P, RODRIGUES ML. Vesicular transport across the fungal cell wall. **Trends Microbiol**, v. 17, p. 158-162, 2009.

CHARRON AJ, SIBLEY LD. Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. **Traffic**, v. 5, p. 855-867, 2004.

CHEN SC, WRIGHT LC, SANTANGELO RT, MULLER M, MORAN VR, KUCHEL PW, SORRELL TC. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 65, p. 405-411, 1997.

CINTRA WM, DE SOUZA W. Distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes in the cell membranes of *Toxoplasma gondii*. **Eur J Cell Biol**, v. 37, p. 63-69, 1985.

COPPENS I, JOINER K. Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* entry by modulating organelle discharge. **Mol Biol Cell**, v. 14, p. 3804-3820, 2003.

COPPENS I, DUNN JD, ROMANO JD, PYPART M, ZHANG H, BOOTHROYD JC, JOINER KA. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. **Cell**, v. 125, p. 261-274, 2006.

COPPIN A, DZIERSZINSKI F, LEGRAND S, MORTUAIRE M, FERGUSON D, TOMAVO S. Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. **Biochimie**, v. 85, p. 353-361, 2003.

COPPIN A, VARRÉ JS, LIENARD L, DAUVILLÉE D, GUÉRARDEL Y, SOYER-GOBILLARD MO, BULÉON A, BALL S, TOMAVO S. Evolution of plant-like crystalline storage polysaccharide in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* argues for a red alga ancestry. **J Mol Evol**, v. 60, p. 257-267, 2005.

DE KRUIJFF B, GERRITSEN WJ, OERLEMANS A, DEMEL RA, VAN DEENEN LL. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. I. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics. **Biochim Biophys Acta**, v. 339, p. 30-43, 1974.

DE MELO EJ, DE SOUZA W. A cytochemistry study of the inner membrane complex of the pellicle of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Res**, v. 83, p. 252-256, 1997.

DE SOUZA W. Demonstration and structure of the microtubular system of *Toxoplasma gondii*. **C R Acad Sci D.**, v. 275, p. 2899-2901, 1972.

DE SOUZA W, ATTIAS M, RODRIGUES JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, p. 2069-2080, 2009.

DE SOUZA W, MARTINS-DUARTE E, LEMGRUBER L, ATTIAS M, VOMMARO RC. Structural organization of the tachyzoites of *Toxoplasma gondii*, *Scientia Medica (in press)*, 2010.

DE SOUZA PEREIRA R, GEIBEL J. Direct observation of oxidative stress on the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* strains with atomic force microscopy. **Mol Cell Biochem**, v. 201, p. 17-24, 1999.

DE WINTER DA, SCHNEIJDENBERG CT, LEBBINK MN, LICH B, VERKLEIJ AJ, DRURY MR, HUMBEL BM. Tomography of insulating biological and geological materials using focused ion beam (FIB) sectioning and low-kV BSE imaging. **J Microsc**, v. 233, p. 372-383, 2009.

DENTON H, ROBERTS CW, ALEXANDER J, THONG KW, COOMBS GH. Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 137, p. 103-108, 1996.

DOBROWOLSKI JM, SIBLEY LD. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by actin cytoskeleton of the parasite. **Cell**, v. 84, p. 933-939, 1996.

DUBEY JP. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Vet Parasitol**, v. 126, p. 57-72, 2004.

DUBEY JP, BEATTIE CP. Toxoplasmosis of animal and man. Boca Raton, FL: crc press, H.P.A. p. 1-20. 1988.

DUBEY JP, LINDSAY DS, SPEER C. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and Sporozoites and Biology and development of tissue cysts. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, p. 267-299, 1998.

DUBREMETZ JF, GARCIA-RÉGUET N, CONSEIL V, FOURMAUX MN. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. **Int J Parasitol**, v. 28, p. 1007-1013, 1998.

DZIERSZINSKI F, POPESCU O, TOURSEL C, SLOMIANNY C, YAHIAOUI B, TOMAVO S. The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* expresses two functional plant-like glycolytic enzymes. Implications for evolutionary origin of apicomplexans. **J Biol Chem**, v. 274, p. 24888–24895, 1999.

DZIERSZINSKI F, MORTUAIRE M, DENDOUGA N, POPESCU O, TOMAVO S. Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **J Mol Biol**, v. 309, p. 1017–1027, 2001.

DZIERSZINSKI F, NISHI M, OUKO L, ROOS DS. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. **Eukariot Cell**, v. 3, p. 992-1003, 2004.

FERGUSON DJ. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. **Int J Parasitol**, v. 34, p. 347-360, 2004.

FERGUSON DJ, HUTCHISON WM. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. **Parasitol Res**, v. 73, p. 483-491, 1987a.

FERGUSON DJ, HUTCHISON WM. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v. 411, p. 39-43, 1987b.

FERGUSON DJ, PARMLEY SF. *Toxoplasma gondii* MAG1 protein expression. **Trends Parasitol**, v. 18, p. 482, 2002.

FERGUSON DJ, DUBREMETZ JF. The ultrastructure of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma gondii – The model apicomplexan: perspectives and methods*. Ed Associated Press, p. 19-48, 2007.

FERREIRA AM, MARTINS MS, VITOR RW. Virulence for BALB/c mice antigenic diversity for eight *Toxoplasma gondii* strains isolated from animals and humans in Brazil. **Parasite**, v. 8, p. 99-105, 2001.

FERREIRA AM, VITOR RWA, GAZZINELLI RT, MELO MN. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infect Genet Evol**, v. 6, p. 22-31, 2006.

FERREIRA-DA-SILVA MF, BARBOSA HS, GROSS U, LÜDER CG. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. **Mol Biosyst**, v. 4, p. 824-834, 2008.

FERREIRA-DA-SILVA MF, TAKÁCS AC, BARBOSA HS, GROSS U, LÜDER CG. Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. **Int J Med Microbiol**, v. 299, p. 381-388, 2009a.

FERREIRA-DA-SILVA MF, RODRIGUES RM, ANDRADE EF, CARVALHO L, GROSS U, LÜDER CG, BARBOSA HS. Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 196-200, 2009b.

FICHERA ME, ROOS DS. A plastid organelle as drug target in apicomplexan parasites. **Nature**, v. 390, p. 407-409, 1997.

FLEIGE T, FISCHER K, FERGUSON DJ, GROSS U, BOHNE W. Carbohydrate metabolism in the *Toxoplasma gondii* apicoplast: localization of three glycolytic isoenzymes, the single pyruvate dehydrogenase complex, and a plastid phosphate translocator. **Eukaryot Cell**, v. 6, p. 984-996, 2007.

FOUSSARD F, LERICHE MA, DUBREMETZ JF. Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. **Parasitology**, v. 102, p. 367-370, 1991.

FURTADO GC, SLOWIK M, KLEINMAN HK, JOINER KA. Laminin enhances binding of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to J774 murine macrophage cells. **Infect Immun**, v. 60, p. 2337-2342, 1992.

FREYRE A. Separation of *Toxoplasma gondii* cysts from brain tissue and liberation of viable bradyzoites. **J Parasitol**, v. 81, p. 1008-1010, 1995.

GLASNER PD, SILVEIRA C, KRUSZON-MORAN D, MARTINS MC, BURNIER M, SILVEIRA S, CAMARGO ME, NUSSENBLATT RB, KASLOW RA, BELFORT

R. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **American J Ophthalmol**, v. 114, p. 136-144, 1992.

GLEESON, MT. 2000. The plastid in Apicomplexa: what use is it? **Int J Parasitol**, v. 30, p. 1053-1070.

GONÇALVES AB, SANTOS IM, PATERSON RR, LIMA N. FISH and Calcofluor staining techniques to detect in situ filamentous fungal biofilms in water. **Rev Iberoam Micol**, v. 23, p. 194-198, 2006.

GONÇALVES MF, UMEZAWA ES, KATZIN AM, DE SOUZA W, ALVES MJ, ZINGALES B, COLLI W. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Exp Parasitol**, v. 72, p. 43-53, 1991.

GROSS U, BOHNE W, SOETE W, DUBREMETZ JF. Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Today**, v. 12, p. 30-33, 1996.

GUIMARÃES EV, ACQUARONE M, DE CARVALHO L, BARBOSA HS. Anionic sites on *Toxoplasma gondii* tissue cyst wall: expression, uptake and characterization. **Micron**, v. 38, p. 651-658, 2007.

GUIMARÃES EV, DE CARVALHO L, BARBOSA HS. Primary culture of skeletal muscle cells as a model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis. **J Parasitol**, v. 94, p. 72-83, 2008.

GUIMARÃES EV, DE CARVALHO L, BARBOSA HS. Interaction and cystogenesis of *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells *in vitro*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 170-174, 2009.

HAGER KM, STRIEPEN B, TILNEY LG, ET AL. The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **J Cell Sci**, v. 112, p. 2631-2638, 1999.

HAKANSSON S, CHARRON AJ, SIBLEY LD. *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. **EMBO J**, v. 20, p. 3132-3144, 2001.

HALONEN SK, WEIDNER E. Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments. **J Eukaryot Microbiol**, v. 41, p. 65-71, 1994.

HALONEN SK, WEISS LM, CHIU FC. Association of host cell intermediate filaments with *Toxoplasma gondii* cysts in murine astrocytes *in vitro*. **Int J Parasitol**, v. 28, p. 815-823, 1998.

HEKKING LH, LEBBINK MN, DE WINTER DA, SCHNEIJDENBERG CT, BRAND CM, HUMBEL BM, VERKLEIJ AJ, POST JA. Focused ion beam-scanning electron microscope: exploring large volumes of atherosclerotic tissue. **J Microsc**, v. 235, p. 336-347, 2009.

HEUSER JE. The quick-freeze deep-etch method of preparing samples for high resolution, 3-D electron microscopy. **Trends Biochem Sci**, v. 6, p. 64–68, 1981.

HEYMANN JA, SHI D, KIM S, BLISS D, MILNE JL, SUBRAMANIAM S. 3D imaging of mammalian cells with ion-abrasion scanning electron microscopy. **J Struct Biol**, v. 166, p. 1-7, 2009.

HILL DE, DUBEY JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clin Microbiol Infect**, v. 8, p. 634-640, 2002.

HOWE DK, SIBLEY LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **J Infect Dis**, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

HILL DE, CHIRUKANDOTH S, DUBEY JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Res Rev**, v. 6, p. 41-61, 2005.

HU K, ROOS DS, MURRAY JM. A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. **J Cell Biol**, v. 156, p.1039-1050, 2002.

INKSON BJ, MULVIHILL M, MÖBUS G. 3D determination of grain shape in a FeAl-based nanocomposite by 3D FIB tomography. **Scr Mater**, v. 45, p. 753–758, 2001.

JOINER KA, ROOS DS. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. **J Cell Biol**, v. 157, p. 557-563, 2002.

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

KAMMER D, MENDOZA R, BARNETT SA, VOORHEES PW. The three-dimensional microstructure of materials: measurement and analysis. **Microsc Microanal**, v. 11, p. 72–73, 2005.

KARASOV AO, BOOTHROYD JC, ARRIZABALAGA G. Identification and disruption of a rhoptry-localized homologue of sodium hydrogen exchangers in *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, v. 35, p. 285-291, 2005.

KINSKY SC. Antibiotic interaction with model membranes. **Annu Rev Pharmacol**, v. 10, p. 119-142, 1970.

KÖHLER S, DELWICHE C, DENNY D, TILNEY L, WEBSTER P, WILSON R, PALMER J, ROOS D. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. **Science**, v. 275, p. 1485-1489, 1997.

LEBRUN M, MICHELIN A, EL HAJJ H, PONCET J, BRADLEY PJ, VIAL H, DUBREMETZ JF. The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. **Cell Microbiol**, v. 7, p. 1823-1833, 2005.

LEMGRUBER L, DE SOUZA W, VOMMARO RC. Freeze-fracture study of the dynamics of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole development. **Micron**, v. 39, p. 177-183, 2008.

LEMGRUBER L, KLOETZEL JA, SOUZA W, VOMMARO RC. *Toxoplasma gondii*: further studies on the subpellicular network. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 706-709, 2009.

LIPKE PN, OVALLE R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. **J Bacteriol**, v. 180, p. 3735-3740, 1998.

LINDER M, WINIECKA-KRUSNELL J, LINDER E. Use of recombinant cellulose-binding domains of *Trichoderma reesei* cellulase as a selective immunocytochemical marker for cellulose in protozoa. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, p. 2503-2508, 2002.

LINDSAY DS, MITSCHLER RR, TOIVIO-KINNUCAN MA, UPTON SJ, DUBEY JP, BLAGBURN BL. Association of host cell mitochondria with developing *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Am J Vet Res**, v. 54, p. 1663-1667, 1993.

LUFT BJ, REMINGTON JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clin Infect Dis**, v. 15, p. 211-222, 1992.

LYONS RE, MCLEOD R, ROBERTS CW. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends Parasitol**, v. 18, p. 198-201, 2002.

MAGNO R, LEMGRUBER L, VOMMARO RC, DE SOUZA W, ATTIAS M. Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. **Microsc Res Tech**, v. 67 p. 45-52, 2005..

MANN T, BECKERS C. Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 115, p.257-268, 2001.

MARTIN AM, LIU T, LYNN BC, SINAI AP. The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. **J Eukaryot Microbiol**, v. 54, p. 25-28, 2007.

MATSUBAYASHI H, AKAO S. Morphological studies on the development of the *Toxoplasma* cyst. **Am J Trop Med Hyg**, v. 12, p. 321-333, 1963.

MAZUMDAR J, H WILSON E, MASEK K, A HUNTER C, STRIEPEN B. Apicoplast fatty acid synthesis is essential for organelle biogenesis and parasite survival in *Toxoplasma gondii*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, p. 13192-13197, 2006.

MELE A, PATERSON PJ, PRENTICE HG, LEONI P, KIBBLER CC. Toxoplasmosis in bone marrow transplantation: a report of two cases and systematic review of the literature. **Bone Marrow Transpl**, v. 29, p. 691-698, 2002.

MELO EJ, ATTIAS M, DE SOUZA W. The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. **J Struct Biol**, v. 130, p. 27-33, 2000.

MERCIER, C.; DUBREMETZ, J.F.; RAUSCHER, B.; LECORDIER, L.; SIBLEY, L.D. E CEBRON-DELAUW, M.F. Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. **Mol Biol Cell**, v. 13, p. 2397-2409, 2002.

MERCIER C, ADJOGLE KD, DÄUBENER W, DELAUW MF. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? **Int J Parasitol**, v. 35, p. 829-849, 2005.

MIRANDA K, DE SOUZA W, PLATTNER H, HENTSCHEL J, KAWAZOE U, FANG J, MORENO SN. Acidocalcisomes in Apicomplexan parasites. **Exp Parasitol**, v. 118, p. 2-9, 2008.

MORDUE DG, DESAI N, DUSTIN M, SIBLEY LD. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their anchoring. **J Exp Méd**, v. 190, p. 1783-1792, 1999a.

MORDUE DG, HAKANSSON S, NIESMAN I, SIBLEY LD. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. **Exp Parasitol**, v. 92, p. 87-99, 1999b.

MORENO SN, ZHONG L. Acidocalcisomes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Biochem J**, v. 313, p. 655-659, 1996.

MORISAKI JH, HEUSER JE, SIBLEY LD. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. **J Cell Sci**, v. 108, p. 2457-2464, 1995.

MORRISSETTE N, SIBLEY LD. Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 66, p. 21-38, 2002.

MORRISSETTE NS, MURRAY JM, ROOS DS. Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **J Cell Sci**, v. 110, p. 35-42, 1997.

NEFF RJ, BENTON WF. Localization of cellulose in the cysts of *Acanthamoeba* sp. **J Protozool**, v. 9, p. 11, 1962.

NGÔ HM, YANG M, JOINER KA. Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules? **Mol Microbiol**, v. 52, p. 1531-1541, 2004.

NICOLLE C, MANCEAUX L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) due gondi. **Compt rend Acad d sc**, v. 147, p. 763-766, 1908.

NICHOLS BA, CHIAPPINO ML, PAVESIO CE. Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Res**, v. 80, p. 91-98, 1994.

NISHI M, HU K, MURRAY JM, ROOS DS. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. **J Cell Sci**, v. 121:1559-1568, 2008.

NISHIKAWA Y, QUITTNAT F, STEDMAN TT, VOELKER DR, CHOI JY, ZAHN M, YANG M, PYPAERT M, JOINER KA, COPPENS I. On the biogenesis of lipid bodies in ancient eukaryotes: synthesis of triacylglycerols by a *Toxoplasma* DGAT1-related enzyme. **Cell Microbiol**, v. 7, p. 849-867, 2005.

NORMAN AW, SPIELVOGEL AM, WONG RG. Polyene antibiotic – sterol interaction. **Adv Lipid Res**, v. 14, p. 127-170, 1976.

NOSANCHUK JD, NIMRICHTER L, CASADEVALL A, RODRIGUES ML. A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis. **Commun Integr Biol**, v. 1, p. 37-39, 2008.

OUAISSI A, AGUIRRE T, PLUMAS-MARTY B, PIRAS M, SCHÖNECK R, GRASMASSE H, TAIBI A, LOYENS M, TARTAR A, CAPRON A, ET AL. Cloning and sequencing of a 24-kDa *Trypanosoma cruzi* specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody. **Biol Cell**, v. 75, p. 11-17, 1992.

PACHECO-SOARES C, DE SOUZA W. Labeled probes inserted in the macrophage membrane are transferred to the parasite surface and internalized during cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Res**, v. 86, p. 11-17, 2000.

PARMLEY SF, YANG S, HARTH G, SIBLEY LD, SUCHARCZUK A, REMINGTON JS. Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii*

antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. **Mol Biochem Parasitol**, v. 66, p. 283-296, 1994.

PAVESIO CE, CHIAPPINO ML, SETZER PY, NICHOLS BA. *Toxoplasma gondii*: differentiation and death of bradyzoites. **Parasitol Res**, v. 78, p. 1-9, 1992.

PELLETIER L, STERN CA, PYPAERT M, SHEFF D, NGÔ HM, ROPER N, HE CY, HU K, TOOMRE D, COPPENS I, ROOS DS, JOINER KA, WARREN G. Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. **Nature**, v. 418, p. 548-552, 2002.

POPIEL I, GOLD MC, BOOTH KS. Quantification of *Toxoplasma gondii* bradyzoites **J Parasitol**, v. 82, p. 330-332, 1996.

QUITTNAT F, NISHIKAWA Y, STEDMAN TT, VOELKER DR, CHOI JY, ZAHN MM, MURPHY RC, BARKLEY RM, PYPAERT M, JOINER KA, COPPENS I. On the biogenesis of lipid bodies in ancient eukaryotes: synthesis of triacylglycerols by a *Toxoplasma* DGAT1-related enzyme. **Mol Biochem Parasitol**, v.138, p. 107-122, 2004.

RAVINDRAN S, BOOTHROYD JC. Secretion of proteins into host cells by Apicomplexan parasites. **Traffic**, v. 9, p. 647-656, 2008.

REMYNGTON JS, MCLEOD R, DESMONTS G. Toxoplasmosis. **In Infectious Diseases of the fetus and newborn infant**, p. 140-267. (W.B. Saunders Company, Philadelphia), 1995.

RENKEMA GH, BOOT RG, MUIJSERS AO, DONKER-KOOPMAN WE, AERTS JM. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. **J Biol Chem**, v. 270, p. 2198-2202, 1995.

ROBERTS F, MCLEOD R. Pathogenesis of Toxoplasmic Retinochoroiditis. **Parasitol Today**, v. 15, p. 51-57, 1999.

RODRIGUES ML, NIMRICHTER L, OLIVEIRA DL, FRASES S, MIRANDA K, ZARAGOZA O, ALVAREZ M, NAKOUZI A, FELDMESSER M, CASADEVALL A. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. **Eukaryot Cell**, v. 6, p. 48-59, 2007.

RODRIGUES ML, NAKAYASU ES, OLIVEIRA DL, NIMRICHTER L, NOSANCHUK JD, ALMEIDA IC, CASADEVALL A. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryot Cell**, v. 7, p. 58-67, 2008.

SADAK A, TAGHY Z, FORTIER B, DUBREMETZ JF. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 29, p. 203-211, 1988.

SAFFER LD, MERCEREAU-PIUJALON O, DUBREMETZ JF, SCHWARTZMAN JD. Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. **J Protozool**, v. 39, p. 526-530, 1992.

SAMUEL BU, HEARN B, MACK D, WENDER P, ROTHBARD J, KIRISITS MJ, MUI E, WERNIMONT S, ROBERTS CW, MUENCH SP, RICE DW, PRIGGE ST, LAW AB, MCLEOD R. Delivery of antimicrobials into parasites. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 14281-14286, 2003.

SANTOS JM, LEBRUN M, DAHER W, SOLDATI D, DUBREMETZ JF. Apicomplexan cytoskeleton and motors: key regulators in morphogenesis, cell division, transport and motility. **Int J Parasitol**, v. 39, p.153-62, 2009.

SCHROEDER-REITER E, PÉREZ-WILLARD F, ZEILE U, WANNER G. Focused ion beam (FIB) combined with high resolution scanning electron microscopy: a promising tool for 3D analysis of chromosome architecture. **J Struct Biol**, v. 165, p. 97-106, 2009

SCHWAB JC, BECKERS CJM, JOINER KA. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 509-513, 1994.

SHAHABUDDIN M, KASLOW DC. Chitinases: a novel target for blocking parasite transmission? **Parasitol Today**, v. 9, p. 252-255, 1993.

SHAW MK, ROOS DS, TILNEY LG. Acidic compartments and rhoptry formation in *Toxoplasma gondii*. **Parasitology** v. 117, p. 435-443, 1998.

SHEFFIELD HG, MELTON ML. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. **J Parasitol**, v. 54, p. 209-226, 1968.

SIBLEY LD, WEIDNER E, KRAHENBUHL JL. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. **Nature**, v. 315, p. 416-419, 1985.

SIBLEY LD, NIESMAN IR, PARMLEY SF, CESBRON-DELAUW MF. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. **J Cell Sci**, v. 108, p. 1669-1677, 1995.

SIEGEL SE, LUNDE MN, GELDERMAN AH, ALTERMAN AH, BROWN JA, LEVINE AS, GRAW RG. Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. **Blood**, v. 37, p. 388-394, 1971.

SILVEIRA C, FERREIRA R, MUCCIOLI C, NUSSENBLATT R, BELFORT R. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. **Am J Ophthalmol**, v. 136, p. 370-371, 2003.

SINAI AP, JOINER KA. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. **J Cell Biol**, v. 154, p. 95-108, 2001.

SOËTE M, DUBREMETZ JF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion *in vitro*. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 219, p. 76-80, 1996.

SOËTE M, CAMUS D, DUBREMETZ JF. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* *in vitro*. **Exp Parasitol** v. 78, p. 361-370, 1994.

SOLDATI D, DUBREMETZ JF, LEBRUN M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, v. 31, p. 1293-1302, 2001.

SPLENDORE A. Un nuovo protozoo parassito de'conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malatti che ricorda in molti punti il kala-zar dell'umo. Nota prelininare pel. **Rev Soc Sci S Paulo**, v. 3, p. 109-112, 1908.

SUSS-TOBY E, ZIMMERBERG J, WARD GE. *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 8413-8418, 1996.

TANABE K. Visualization of the mitochondria of *Toxoplasma gondii*-infected mouse fibroblasts by the cationic permeant fluorescent dye rhodamine 123. **Experientia**, v. 41, p. 101-102, 1985.

TANAKA K, MITSUSHIMA A. A preparation method for observing intracellular structures by scanning electron microscopy. **J Microsc**, v. 133, p. 213-22, 1984.

TENTER AM, HECKEROTH AR, WEISS LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol**, v.30, p. 1217-1258, 2000.

THÉRY C, OSTROWSKI M, SEGURA E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nat Rev Immunol**, v. 9, p. 581-593, 2009.

THIÉRY JP. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. **J Microscopic**, v. 6, p. 987-1018, 1967.

TOMAVO S, BOOTHROYD JC. Interconnection between organellar functions, development and drug resistance in the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, v. 25, p. 1293-1299, 1995.

TROCOLI TORRECILHAS AC, TONELLI RR, PAVANELLI WR, DA SILVA JS, SCHUMACHER RI, DE SOUZA W, CUNHA-E-SILVA NC, DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN I, COLLI W, MANSO ALVES MJ. Trypanosoma cruzi: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. **Microbes Infect**, v. 11, p. 29-39, 2009.

TSUBOI T, KANEKO O, EITOKU C, SUWANABUN N, SATTABONGKOT J, VINETZ JM, TORII M. Gene structure and ookinete expression of the chitinase genes of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium yoelii*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 130, p. 51-54, 2003.

WEISS LM, KIM K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Front Biosci**, v. 5, p. 391-405, 2000.

WEISS LM, KIM L. Bradyzoite Development. In: *Toxoplasma gondii* - The model apicomplexan: perspectives and methods. Ed Academic Press, p. 341-366, 2007.

WEISS LM, LAPLACE D, TAKVORIAN PM, TANOWITZ HB, CALI A, WITTNER M. A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. **J Eukaryot Microbiol**, v. 42, p. 150-157, 1995.

WEISS LM, LAPLACE D, TAKVORIAN P, TANOWITZ HB, WITTNER M. The association of the stress response and *Toxoplasma gondii* bradyzoite development. **J Eukaryot Microbiol**, v. 43, p. 120S, 1996.

WEISS LM, MA YF, TAKVORIAN PM, TANOWITZ HB, WITTNER M. Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response. **Infect Immun**, v. 66, p. 3295-3302, 1998.

YANG S, PARMLEY SF. A bradyzoite stage-specifically expressed gene of *Toxoplasma gondii* encodes a polypeptide homologous to lactate dehydrogenase. **Mol Biochem Parasitol**, v. 73 p. 291–294, 1995.

YANG S, PARMLEY SF. *Toxoplasma gondii* expresses two distinct lactate dehydrogenase homologous genes during its life cycle in intermediate hosts. **Gene**, v. 184, p. 1–12, 1997.

YONEDA A, DOERING TL. A eukaryotic capsular polysaccharide is synthesized intracellularly and secreted via exocytosis. **Mol Biol Cell**, v. 17, p. 5131-5140, 2006.

ZARAGOZA O, RODRIGUES ML, DE JESUS M, FRASES S, DADACHOVA E, CASADEVALL A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Adv Appl Microbiol**, v. 68, p. 133-216, 2009.

ZHANG YW, HALONEN SK, MA YF, WITTNER M, WEISS LM. Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. **Infect Immun**, v. 69, p. 501-507, 2001.

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](#)