

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

**CONVERSÃO *IN VITRO* DE TAQUIZOÍTOS EM BRADIZOÍTOS DE *TOXOPLASMA*
GONDII EM CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS**

por

MARIALICE DA FONSECA FERREIRA DA SILVA

Rio de Janeiro

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

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

**CONVERSÃO *IN VITRO* DE TAQUIZOÍTOS EM BRADIZOÍTOS DE *TOXOPLASMA*
GONDII EM CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS**

por

MARIALICE DA FONSECA FERREIRA DA SILVA

Tese apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências na área de
Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Dra. Helene Santos Barbosa

Rio de Janeiro
2008

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

Esta tese intitulada:

CONVERSÃO *IN VITRO* DE TAQUIZOÍTOS EM BRADIZOÍTOS DE *TOXOPLASMA GONDII* EM CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS

Apresentada por:

MARIALICE DA FONSECA FERREIRA DA SILVA

Banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra Joseli Lannes Vieira – LABAIIIR / Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz (presidente)

Dr. Renato Augusto DaMatta – CBB/ Universidade Norte Fluminense

Prof. Dr. Oliver Liesenfeld – Charité Medical School Berlin - Berlin

Dra. Lais de Carvalho – LHE/Instituto de Biologia/UERJ (suplente)

Dr. Erick V. Guimarães – LBE/ Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz (suplente)

Tese defendida e aprovada em 22 de julho de 2008.

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

S586

Silva, Marialice da Fonseca Ferreira da

Conversão in vitro de taquizoitos em bradizoitos de toxoplasma gondii em células musculares esqueléticas / Marialice da Fonseca Ferreira da Silva. – Rio de Janeiro, 2008.

xii, 107 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2008.

Bibliografia: f. 58-75

1. Toxoplasma gondii. 2. Estágio conversão. 3. Músculo esquelético. 4. Diferenciação. 5. Bradizoitos. I. Título.

CDD 593.19

Esta tese foi desenvolvida sob orientação da Dra. Helene Santos Barbosa no Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ e no Instituto de Microbiologia Médica da Universidade de Göttingen, Alemanha, como parte do programa de Doutorado Sanduíche da CAPES e teve o apoio financeiro das seguintes entidades:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

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

Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)

Deutsch Akademischer Austauschdienst (DAAD)

Katholischer Akademischer Austauschdienst (KAAD) - KAAD/KHG Göttingen

Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde – PAPES IV

Data da matrícula no programa de Mestrado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz: agosto de 2004.

Eu dedico esta tese aos grandes amores da minha vida: minha querida mãe Helena e ao meu noivo Christoph Heider.

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Dra Helene Barbosa pelo exemplo de responsabilidade, credibilidade, amizade, lealdade, profissionalismo, pela minha formação, pelos caminhos que você abriu, pela amizade. Serei eternamente grata por tudo. Obrigada. Muito obrigada.

Ao Prof Dr Uwe Gross e especialmente ao Dr Carsten Lüder, pela excelente oportunidade, um marco na minha carreira científica.

Ao Dr. Wolfgang Bohne, pelas discussões sobre estágio conversão do *Toxoplasma*.

A Dra Solange pela revisão desta tese e pelos valores que passa aos alunos em nosso dia a dia.

À Alessandra Ferreira e a Mariana Acquarone pela amizade, ensinamentos sobre a cultura das CMEs e por vibrarem com as minhas conquistas.

À querida Lourdes, pelo excelente apoio, prontidão e pela torcida em cada etapa das minhas aventuras científicas;

À minha equipe do LBE e em especial ao Erick, por tudo que aprendi com você.

Eu sou grata a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e ao Deutsch Akademischer Austauschdienst (DAAD) que suportaram financeiramente o meu Doutorado Sanduíche.

Ao Dr Thomas Krüggeler, do serviço de bolsas de extensão a pesquisadores estrangeiros (Katholischer Akademischer Ausländer-Dienst - KAAD) e à Dr. Cecília Leon Ramirez (KHG – Göttingen) por me ampararem no momento de minha extensão no doutorado Sanduíche.

Aos grandes amigos e pesquisadores do antigo Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular, hoje LBC, LBE, LUC e ainda ao grupo de biofilmes, obrigada pela amizade, pela torcida, pelo ambiente espetacular de trabalho.

Aos grandes amigos que fiz na Universidade de Göttingen.

À minha família (minhas mães Helena e Marilza, minha irmã Elisabete e minha sobrinha Maria Rita) por tanto amor.

Em especial à minha mãe Helena, pelos ensinamentos de coragem, determinação, retidão, perseverança, fé e por ser a minha melhor amiga.

À Kelly Salomão, Mariana Waghabi e Carolina Spiegel pelo laço de real de fraternidade. A Juliana Dias, a Tatiana Galvão e Daniel Adesse pela cumplicidade e amizade que nunca vi igual. Sem vocês... eu nem sei....

Ao Christoph e à família Heider pelo amor imensurável, confiança e amizade.

Por último, e mais importante ao meu Deus Pai todo poderoso.

RESUMO

A diferenciação no desenvolvimento é um processo fundamental em organismos vivos. É essencial em organismos multicelulares e comum entre procariotos e eucariotos unicelulares. No caso de protozoários parasitas, tal diferenciação é freqüentemente um processo obrigatório que distingue estágios do ciclo de vida sendo requerido para (i) reprodução sexual, (ii) transmissão entre os hospedeiros mamíferos e vetores invertebrados, ou para (iii) sobrevivência dentro de diferentes nichos no hospedeiro. Embora seja do conhecimento que *Toxoplasma gondii* forma cistos preferencialmente no cérebro e na musculatura esquelética, pouca atenção tem sido dada às células musculares esqueléticas como um tipo celular para estudo da estágio-conversão do parasito. A persistência na musculatura esquelética é crítica para a sua transmissão para humanos através da ingestão de carne crua ou mal passada. Na presente tese, culturas primárias de células musculares esqueléticas (CME) foram altamente diferenciadas, apresentando miotubos que contraíam espontaneamente e expressavam marcadores específicos, tais como Myf5, MyoD e desmina. Com o objetivo de investigar *in vitro* a diferenciação do *Toxoplasma*, CME foram infectadas com taquizoítos de *Toxoplasma* e a estágio-conversão entre taquizoítos e bradizoítos analisadas até seis dias após infecção por imunofluorescência. A diferenciação dos taquizoítos teve início espontaneamente após 1 dia de infecção apresentando a seguinte taxa de vacúolos contendo bradizoítos: 0 % (4h), 23,8 ±3,4 % (1 dpi); 31,0 ± 2,0 % (2 dpi); 33,0 ±3,5 % (4dpi) e 46,0 ±3,5 % (6dpi). Após 2 e 4 dias de infecção, vacúolos contendo bradizoítos e rosetas de *Toxoplasma* em estágio conversão assincrônica foram detectados. Com o objetivo de checar se o tipo celular é determinante neste intrigante fenômeno, os mesmos experimentos foram realizados em dois outros tipos de células hospedeiras: linhagem de mioblasto (L6C10) de rato diferenciada *in vitro* em miotubos maduros e em linhagem de fibroblasto de camundongo (L929). Altas taxas foram detectadas na linhagem de mioblasto L6.C10: 35,2 ± 4, 6 % (4 dpi) e 64% (6 dpi). Em contraste, na linhagem de fibroblasto de rato (L929), a taxa de diferenciação do *Toxoplasma* não alcançou 20%. Além disso, quando analisados por RT-PCR em tempo real, o RNA total de culturas de CMEs infectadas com taquizoítos de *Toxoplasma* continha quantidades crescentes de transcritos de ENO1, um marcador específico para o estágio bradizoíta. Nós também desenvolvemos experimentos de estágio conversão induzida, aplicando condições de estresse exógenos, tais como pH alcalino e citocina. Nossos dados revelaram que altas taxas de estágio conversão do *Toxoplasma* ocorrem em CME, sem requerer fatores de estresse exógenos, tais como drogas, mudanças na temperatura ou pH. Nós acreditamos que CMEs possam apresentar um nicho apropriado para o *Toxoplasma* estabelecer a fase crônica da infecção e desta forma, ser um potente/modelo celular para o estudo do intrigante processo de diferenciação de taquizoítos-bradizoítos *in vitro*.

ABSTRACT

Developmental differentiation is a fundamental process in living organisms. It is essential in multicellular organisms and is common among prokaryotes and unicellular eukaryotes. In the case of protozoan parasites, such differentiation most frequently is an obligatory process with distinct life cycle stages being required for (i) sexual reproduction, (ii) for transmission between mammalian hosts and invertebrates vectors, or (iii) for survival within distinct niches of the host. Although it is already known that *Toxoplasma gondii* form cysts preferentially in the brain and in the skeletal muscles, little attention has been paid to skeletal muscle cells as a cell type to study *Toxoplasma* stage conversion. Persistence within muscle tissue is critical for parasite transmission to humans via raw or undercooked meat. In the present thesis work, primary cultures of skeletal muscle (SkMC) were highly differentiated, displaying myotubes which contracted spontaneously *in vitro* and expressed markers specific to SkMC, such as myf5, myoD and desmin. Owing to investigate *in vitro* differentiation of *Toxoplasma*, SkMCs were infected with *Toxoplasma* tachyzoites and tachyzoite-bradyzoite stage conversion analysed till 6 days post infection by immunofluorescence. The tachyzoite differentiation started spontaneously at 1 day post infection, displaying the following rate of vacuoles containing bradyzoites: 0 % (4h), 23.8 ± 3.4 % (1 dpi); 31.0 ± 2.0 % (2 dpi); 33.0 ± 3.5 % (4 dpi) and 46.0 ± 3.5 % (6 dpi). At 2 and 4 dpi, vacuoles containing bradyzoites and rosettes of *Toxoplasma* in asynchronous stage conversion were detected. In order to check if the host cell was determinant to this intriguing phenomenon, the same experiments were carried in 2 others different host cell: a rat myoblast cell line (L6C10) differentiated *in vitro* into mature myotubes and a mouse fibroblast cell line (L929). High rates were detected in the L6.C10 myoblast cell line: 35.2 ± 4.6 % (4 dpi) and 64% (6 dpi). In contrast, in mouse fibroblast cell line (L929), the rate of *Toxoplasma* differentiation did not reach 20%. In addition, when analysed by real time RT-PCR, total RNA from SkMC infected by *Toxoplasma* tachyzoites contained increasing amounts of bradyzoite-specific ENO1 transcripts until 6 dpi. We also carried experiment inducing the stage conversion, by applying exogenous stress conditions, as alkaline medium and cytokine. Our data show that high rates of *Toxoplasma* stage conversion takes place in SkMC, without exogenous stress factors being required as drugs, changes in temperature or pH. We believe that SkMC might be an appropriate niche to the parasite to establish the chronic phase of the infection and therefore, a potent cell model to study the intriguing process of tachyzoite to bradyzoite differentiation *in vitro*.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	X
I. INTRODUÇÃO	1
1. <i>Toxoplasma gondii</i> - o modelo Apicomplexa	1
2. Biologia do <i>Toxoplasma</i>	2
3. Toxoplasmose em humanos	6
4. <i>T. gondii</i> e a célula hospedeira: invasão e formação do vacúolo parasitóforo	8
5. Tropismo celular e estágio conversão do <i>Toxoplasma</i>	11
6. A célula muscular esquelética	14
6.1 Biologia celular e molecular da miogênese	14
6.2. A cultura primária de célula muscular esquelética	16
II. OBJETIVOS	19
III. MATERIAIS E MÉTODOS	20
1. Isolamento e cultura de células musculares esqueléticas	20
2. Manutenção e diferenciação de linhagem de mioblasto de rato (L6. C10)	21
3. Cultura de linhagem de fibroblasto de camundongo (L929)	21
4. Cultivo do <i>Toxoplasma</i> e infecção das células	22
5. Ensaios de imunofluorescência	22
5.1. Monitoramento da diferenciação das células musculares <i>in vitro</i>	22
5.2. Monitoramento da diferenciação dos parasitos <i>in vitro</i>	23
6. Análises por RT-PCR quantitativo e semiquantitativo (q RT-PCR)	23
6.1. Da expressão genes-músculo específicos	23
6.2. De genes estágio específico do <i>Toxoplasma</i>	24
7. Estágio conversão do <i>Toxoplasma</i> induzido por estresse exógeno	25
7.1. Indução da estágio conversão por aumento do pH e ausência de CO ₂	25
7.2. Indução do estágio conversão com IFN gama em presença de LPS	25
IV. RESULTADOS	27
1. Estabelecimento da miogênese de culturas primárias de CME	27
1.1. Por microscopia de contraste de fase	27
1.2. Por microscopia de fluorescência	27

1.3. Monitoramento da expressão gênica de proteínas músculo-específico	27
2. Estágio conversão taquizoíto-bradizoíto de <i>T. gondii</i> em CME	31
2.1. Monitoramento por imunofluorescência	31
2.2. Monitoramento por qRT-PCR	34
3. Monitoramento da diferenciação de células de linhagem de mioblasto de rato (L6. C10)	34
4. Monitoramento da conversão de taquizoíto-bradizoíto de <i>T. gondii</i> em linhagens celulares de músculo (L6C10) e de fibroblasto (L929)	38
5. Indução do estágio conversão	46
5.1. Indução por aumento do pH e ausência de CO ₂ em cultura primária de CME	46
5.2. Indução com IFN-γ em presença e na ausência de LPS	46
V DISCUSSÃO	48
VI CONCLUSÕES	57
VII BIBLIOGRAFIA	58
VIII ANEXOS	76
ANEXO I – <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoite -to- bradyzoite conversion in skeletal muscle cells in the absence of exogenous stress factors	
ANEXO II – Stress-related and spontaneous stage differentiation of <i>Toxoplasma gondii</i>	

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. *Toxoplasma gondii* - o modelo Apicomplexa

Neste ano de 2008 comemora-se os 100 anos da descrição do *Toxoplasma gondii* por Nicolle e Manceaux, no norte da África, e por Splendore no Brasil. A designação da espécie deste parasito provém do nome de um roedor africano (*Ctenodactylus gondi*) do qual este parasito foi originalmente isolado (Nicolle e Manceaux, 1909; Black e Boothroyd, 2000).

O *T. gondii* é um protozoário classificado como Coccídeo, pertencente ao filo Apicomplexa, que inclui um grande número de parasitos de animais e de humanos, responsáveis por doenças muito conhecidas, tais como malária, toxoplasmose, coccidiose e criptosporidiose (Dubremetz e cols., 1993).

De todos os apicomplexas, o *T. gondii* é o mais acessível experimentalmente, uma vez que: (i) esses parasitos são capazes de infectar *in vitro* qualquer célula nucleada; (ii) os estágios patogênicos são facilmente propagáveis em cultura, produzindo-se quantidades satisfatórias de parasito para experimentação; (iii) o modelo em camundongos é bem estabelecido; (iv) foi o primeiro protozoário obrigatoriamente intracelular a ser transformado utilizando-se DNA exógeno (Donald e Roos, 1993; Kim e cols., 1993), possibilitando assim, o desenvolvimento de ferramentas moleculares de genética reversa para a manipulação de seu genoma (Boothroyd e cols., 1997; Soete e cols., 1999), e ainda, (v) pelo fato de um novo banco de dados das chamadas “expressed sequence tags” (EST), que são etiquetas de seqüências expressas produzidas a partir de bibliotecas de cDNA, ter sido criado para o *T. gondii*. Desta forma, por conta destas facilidades experimentais, o *T. gondii* emerge como um dos mais importantes modelos para o estudo da biologia dos apicomplexas, que incluem mais de 5000 espécies de parasitos (Wilson e cols., 1996; Roos e cols., 1999; revisto em Black e Boothroyd 2000, e em Kim e Weiss, 2004). Há significantes diferenças biológicas entre o *Toxoplasma* e os outros parasitos deste filo, principalmente com relação ao ciclo de biológico que não foi conservado em todas as espécies (Kim e Weiss, 2004). Este protozoário tão bem adaptado é caracterizado por ser um parasito oportunista de ampla distribuição geográfica e por formar cistos teciduais freqüentemente encontrados no sistema nervoso central e na musculatura esquelética de seus hospedeiros, onde persistem

dormentes por longos períodos, levando a uma infecção de longo termo (Hoare, 1972, Gross e cols., 1997; Ellis e cols., 2004).

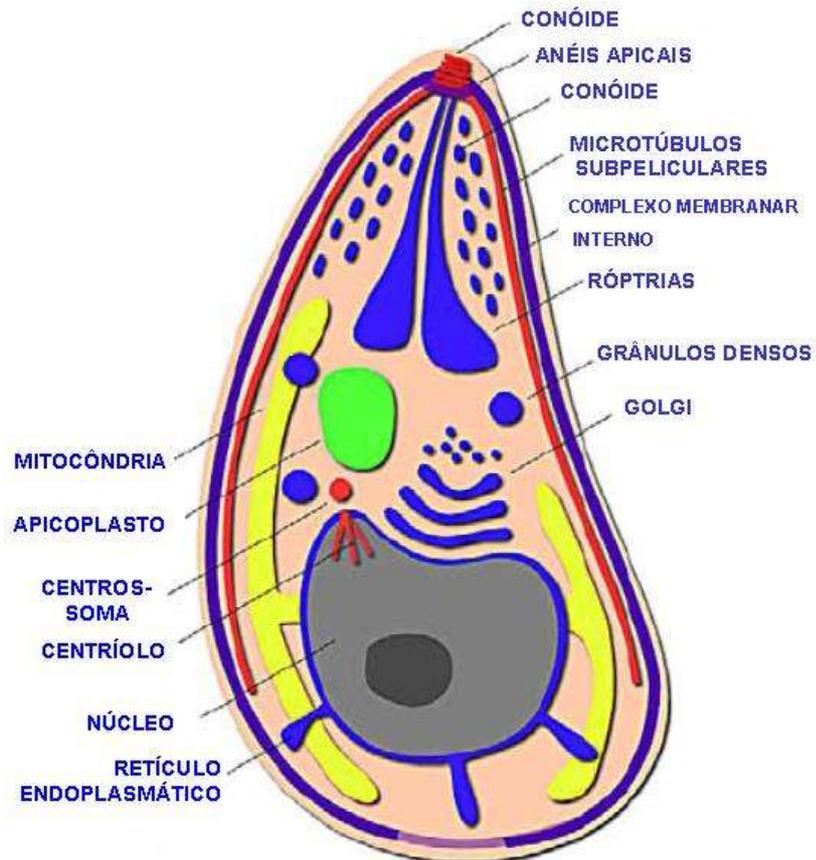
O estabelecimento de uma infecção persistente é uma das principais características deste parasito, sendo necessária para manutenção do seu ciclo de vida. Este fato e a habilidade do *T. gondii* em infectar um amplo espectro de células de vertebrados de sangue quente e de se desenvolver dentro de toda célula nucleada estudada até o momento, faz com que seja um dos protozoários mais bem sucedidos dentre os parasitos obrigatoriamente intracelulares (Boothroyd e cols., 1998).

2. Biologia do *T. gondii*

O *Toxoplasma* se caracteriza pela forma alongada, de meia lua crescente, apresentando uma extremidade mais afilada na região anterior do corpo e mede cerca 7 μm de comprimento e 2 μm de largura, com pequenas variações entre as três formas infectivas (Harboe e Erichsen, 1954; Hogan e cols., 1960).

O *T. gondii* apresenta todas as estruturas típicas de células eucariotas (Esquema 1), sendo a presença do complexo apical (formado pelo conóide e anéis apicais) um importante diferencial que caracteriza o filo apicomplexa (Esquema 2). Além do complexo apical, o *Toxoplasma* possui organelas secretoras como róptrias, micronemas e grânulos densos que desempenham um importante papel na invasão, formação e manutenção do vacúolo parasitóforo, garantindo a sua permanência na célula hospedeira (Joiner e Roos, 2002; Martin e cols., 2007) (Esquema 1). O conóide mede cerca de 250 nm de diâmetro e 280-360 nm de comprimento, formado basicamente por 6-8 microtúbulos e um par central interno, assemelhando-se a uma mola que pode se estender ou retrair dentro do anel polar apical (revisto em Dubey e cols., 1998b; Morissete e Sibley, 2002) (Esquema 2).

O *Toxoplasma* é envolto por uma membrana trilaminar (Dubey e cols., 1998) e contém um plastídeo vestigial, chamado de plastídeo apicomplexa ou apicoplasto, indispensável ao parasito e que vem recebendo atenção especial desde sua



(Reproduzido e adaptado de Striepen e cols., 2007)

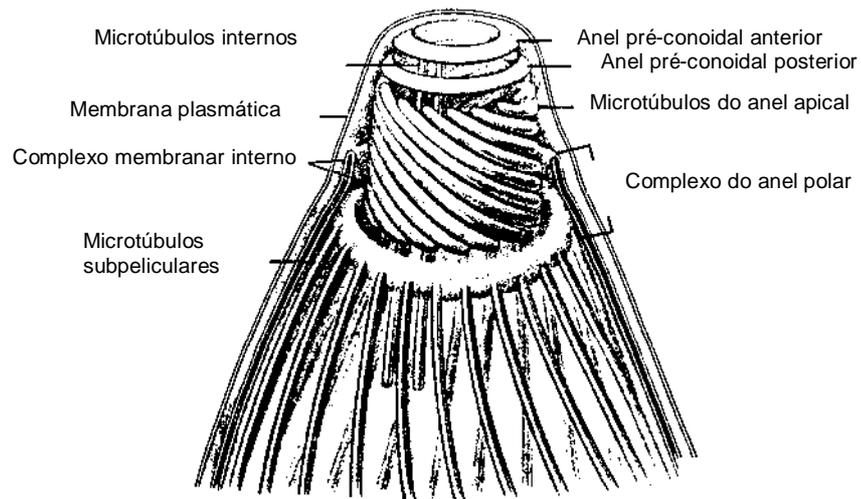
Esquema 1. Representação esquemática de um zoóita, mostrando a ultra-estrutura do *T.gondii*.

descrição (Wilson e cols., 1995; McFadden e cols., 1996; Kohler e cols., 1997; Waller e cols., 1998). Esta organela é envolta por múltiplas membranas, indicando ter sido adquirida por endossimbiose secundária (Kohler e cols., 2006). A endossimbiose primária consiste na incorporação de um procaríoto por um eucarioto e os plastídeos apresentam somente duas membranas. Por outro lado, na endossimbiose secundária, um eucarioto heterotrófico fagocita um eucarioto fotossintético, gerado por uma endossimbiose primária, e assim os plastídeos apresentam quatro membranas (Waller e cols., 1998).

Como o *Toxoplasma* apresentar enzimas glicolíticas homólogas às de plantas e não à de animais, esta organela é uma forte candidata para o desenho de novas abordagens terapêuticas (Kohler e cols., 1997; Ralph e cols., 2001; Seeber, 2003),

além de ser objeto de estudos evolutivos (Willianson e cols., 1994; Egea e Lang-Unasch, 1995; Dziarszinski e cols., 1999).

A mitocôndria do *Toxoplasma* também foi gerada por um processo endossimbiótico e, assim como o apicoplasto, leva seu próprio genoma (Wilson e cols., 1996).



Reproduzido de Nichols & Chiappino (1987)

Esquema 2. Esquema detalhado da região apical do *T. gondii*

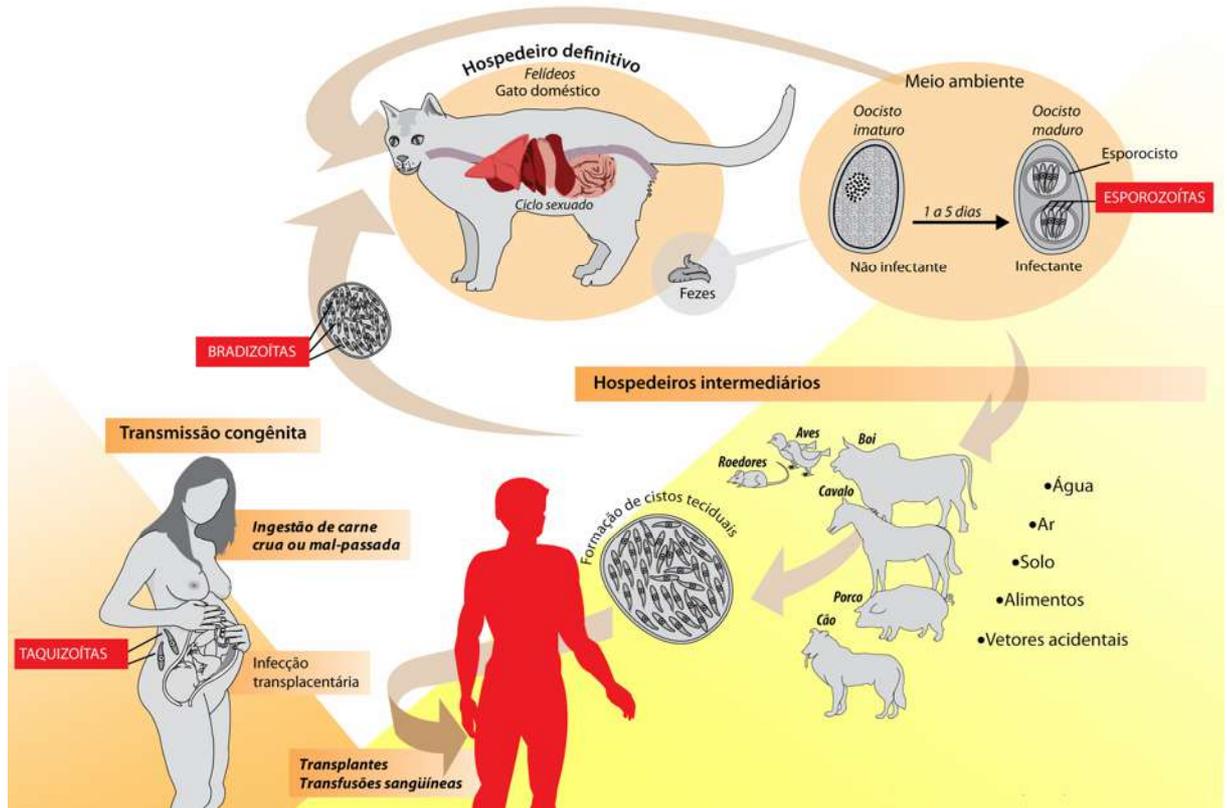
Em termos ultra-estruturais há grandes similaridades entre taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos de *Toxoplasma*, que apresentam organelas características e clássicas dos parasitos apicomplexas (Esquema 1). No entanto, após estágio diferenciação, há diferenças fisiológicas marcantes entre as 3 formas do parasito, incluindo alterações em sua superfície, metabolismo, além da indução de genes associados a essas mudanças (Denton e cols., 1996; Ferguson, 2004, Speer e Dubey, 2005). Diferenças também ocorrem no modo de divisão dos parasitos, e na velocidade com a qual se multiplicam. Os taquizoítos se multiplicam rapidamente dentro do interior dos vacúolos parasitóforos (VP), formando rosetas, lisando as células e posteriormente, infectando células vizinhas. Bradizoítos se dividem lentamente, transformam a membrana do VP em uma parede cística rica em carboidratos e se mantêm isolados no interior da célula por longos períodos (Guimarães e cols., 2003). Essas variações morfológicas refletem diferenças

metabólicas entre os dois estágios (Smith, 1995; Zhang e Smith, 1995, Speer e Dubey, 2005).

O *Toxoplasma* apresenta um ciclo de vida complexo com dois mecanismos de transmissão: (i) ingestão de oocistos produzidos durante o ciclo enteroepitelial do parasito em gatos e, (ii) através do estágio de cisto tecidual presente na fase crônica da infecção dos hospedeiros intermediários (Ferguson, 2004).

Este complexo ciclo de vida resulta em 4 estágios infecciosos: taquizoíta, bradizoíta, merozoíta e esporozoíta, com papéis biológicos distintos. Formas taquizoítas e merozoítas proliferam dentro de um hospedeiro, aumentando a densidade de parasitos. A diferença entre eles é que os taquizoítos passam por uma proliferação indiscriminada em todas células hospedeira nucleadas e se disseminam para todos os tecidos do corpo, enquanto a proliferação dos merozoítos se limita a poucas gerações (2-4) e exclusivamente no interior de enterócitos do intestino delgado do gato (Ferguson, 2004). Além disso, a depender do estado do sistema imune do hospedeiro, taquizoítos podem sofrer diferenciação para bradizoítos, enquanto os merozoítos darão origem aos estágios sexuais -microgametócitos e macrogametócitos. Bradizoítos e esporozoítos têm em comum a transmissão da infecção entre hospedeiros, garantindo assim a sobrevivência ao rigor do ambiente externo e/ou no trato digestivo de um novo hospedeiro.

No curso da evolução, *T. gondii* desenvolveu várias rotas potenciais de transmissão (Esquema 3). No entanto, estes estudos nas últimas três décadas não elucidaram qual (ou quais) a mais importante do ponto de vista epidemiológico. A transmissão do *T. gondii* em humanos ocorre principalmente por: (i) exposição seguida de ingestão acidental de oocistos esporulados, (através de água e/ou solo contaminados com fezes de gatos), (ii) ingestão de carne crua ou mal passada contendo cistos de *Toxoplasma* e (iii) infecção transplacentária (Lopez e cols., 2000). A disseminação da toxoplasmose pode ocorrer também por transplante de órgãos ou medula óssea, pela doação de um órgão infectado com o parasito a um receptor susceptível, ou pela reativação de uma infecção latente no próprio transplantado, devido a tratamento imunossupressor (Jackson e Hutchison, 1989; Luft e cols., 1987; Ho-Yen e cols., 1992).



(Moura, 2008)

Esquema 3. Ciclo de vida do *T. gondii* mostrando as vias de transmissão entre os hospedeiros intermediários e definitivos.

Estudos que indicam que as infecções transmitidas pela ingestão de oocistos são mais graves que as induzidas por infecção por cisto (Benenson e cols., 1982; Dubey e Beattie, 1988; Smith, 1993; Hill e Dubey, 2002). Atualmente não há testes que possam discriminar entre ingestão de oocistos ou de cistos teciduais como fonte de infecção, sendo as evidências da rota de infecção conseguidas por inspeções epidemiológicas (Bahia-Oliveira, 2003).

3. Toxoplasmose em humanos e tratamento

T. gondii é o protozoário mais frequentemente encontrado em infecções oportunistas, sendo especialmente importante em duas situações: durante a gravidez podendo causar manifestações severas neurológicas e oftalmológicas no feto, quando adquirida no primeiro trimestre da gestação, e em pacientes imunocomprometidos, como HIV positivos ou em tratamento pré-transplante de órgãos (revisto em Joiner & Dubremetz, 1993; Sarciron & Gherardi, 2000).

A toxoplasmose se caracteriza por uma fase aguda, seguida por uma fase crônica quando os parasitos estão presentes em cistos teciduais, predominantemente localizados no cérebro e na musculatura. Estes cistos podem transmitir a infecção para outros hospedeiros intermediários ou gatos quando ingeridos (por carnivorismo). O maior problema no tratamento da toxoplasmose é que enquanto as drogas utilizadas podem eliminar taquizoítos, elas têm pouco efeito sobre bradizoítos, que são mantidos como fonte recrudescente da infecção (Luft e Remington, 1992; Montoya & Liesenfeld, 2004). Como resultado, a terapia com drogas é mantida obrigatoriamente durante toda a vida do paciente, o que traz grandes inconvenientes devido à toxicidade da associação da sulfadiazina com a pirimetamina, associada ao uso prolongado das drogas.

A infecção pelo *T. gondii* adquirida durante a gravidez pode causar danos intra-uterinos e, atravessando a placenta, os parasitos podem infectar o feto levando à fase aguda da doença (Foulon e cols., 1999; Ferguson, 2002; 2004). Apesar das conseqüências devastadoras da toxoplasmose congênita serem bem conhecidas como parte da síndrome do TORCH (acrônimo referente à infecção de um feto em desenvolvimento ou recém nascido por qualquer grupo de agente infeccioso, que apresente toxoplasmose, sífilis, rubéola, citomegalovirus e herpes) muitos aspectos da toxoplasmose congênita continuam controversos, por conta de dados incompletos quanto à prevalência da doença e ao impacto do tratamento (Kim, 2006).

Muitos estudos focam a toxoplasmose congênita em humanos, como resultado da transmissão vertical do parasito durante a gravidez. No entanto, pouco se sabe sobre a relativa importância deste tipo de transmissão bem como sobre os reservatórios do parasito na natureza (Tenter e cols., 2000; Jones e cols., 2001).

Um fato interessante é que, estudos epidemiológicos recentes indicam que agentes infecciosos podem contribuir para alguns casos de esquizofrenia (Torrey & Yolken, 2003). Infecções com *Toxoplasma* em animais geraram alteração em funções neurotransmissoras e comportamentais (Webster, 2007). Em humanos, a infecção aguda pode produzir sintomas psicóticos similares aos apresentados por pessoas esquizofrênicas. Além disso, ratos infectados por *Toxoplasma* parecem ser menos neofóbicos (medo persistente e anormal de qualquer coisa nova), levando a diminuição da sua aversão natural ao odor de gatos (Berdoy e cols., 2000). De fato, estudos realizados em 1979, demonstraram que o *Toxoplasma* prejudica o

aprendizado e a memória em camundongos, além de alterar mudanças no comportamento nestes animais e em ratos (Witting, 1979; Webster, 2007).

Nos últimos anos houve um progresso considerável em relação ao desenvolvimento de vacinas contra toxoplasmose, baseada na cepa viva atenuada S48, de uso veterinário (Stanley e cols., 2004). Vacinas são caras, causam efeitos colaterais e tem curto prazo de validade. Sendo vacinas preparadas a partir de organismos vivos, elas podem sofrer reversão para cepas patogênicas e, portanto não são aplicáveis a humanos. Além disso, os cistos não são estruturas estáticas; eles regularmente se rompem ou rompem as células hospedeiras liberando parasitos que reinvasam outras células (Dubey, 1997; Dubey e cols., 1997) e podem dar início a uma resposta inflamatória, resultando na formação de nódulos gliais no cérebro do hospedeiro (Weiss e Kim, 2000).

Alguns experimentos têm demonstrado que vacinas de DNA, que se baseiam na injeção de um plasmídeo de DNA no hospedeiro, passando assim as células a produzir a proteína codificada, poderão vir a ser utilizadas em humanos de (metodologia relativamente nova e que envolve a). Este tipo de vacina induz resposta imune humoral e celular em modelos murinos (Długońska e cols., 2007; Menzies e cols., 2008). Imunização de camundongos com plasmídeo codificando o gene SAG1 (Pit SAG1) levou a uma proteção de 80-100% (Nielsen e cols., 1999). As próximas vacinas de DNA deverão considerar a regulação estágio-específica da imunidade contra o *Toxoplasma* para prevenir e/ou reduzir a formação de cistos nos hospedeiros intermediários (revisto por Boophale, 2003).

4. *T. gondii* e a célula hospedeira: invasão e formação do vacúolo parasitóforo

Patógenos obrigatoriamente intracelulares permanecem confinados num nicho (vacúolo parasitóforo) dentro da célula hospedeira, que lhes assegura fonte de nutrientes e proteção, evitando contato com o sistema imune do hospedeiro. (Coppens e cols., 2006).

Esta situação enigmática de viver em um vacúolo que não é interceptado pelo sistema endocítico da célula hospedeira é a realidade do *T. gondii*. Após a invasão, o parasito exclui ativamente uma série de proteínas da membrana da célula hospedeira, inserindo proteína secretadas pelas róprias e pelos micronemas formando uma membrana vacuolar híbrida (Joiner and Roos, 2002).

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

As etapas de adesão e invasão na célula hospedeira são estratégias cruciais para o *T. gondii* estabelecer a infecção. A penetração do parasito requer que seu pólo anterior (conóide) entre em contato com a superfície da célula hospedeira para desencadear a invaginação da membrana celular. A invasão (15 - 17 segundos) acontece de uma maneira muito mais rápida que a fagocitose (120 segundos), o que sugere participação ativa do parasito neste processo (Nichols e cols., 1981). O processo de entrada começa com o deslizamento do parasito, que utiliza uma adesão reversível para migrar por sobre a superfície da membrana plasmática, estabelecendo assim uma íntima associação com a célula hospedeira (Carruthers e Sibley, 1997; Mordue e cols., 1999; Alexander e cols., 2005).

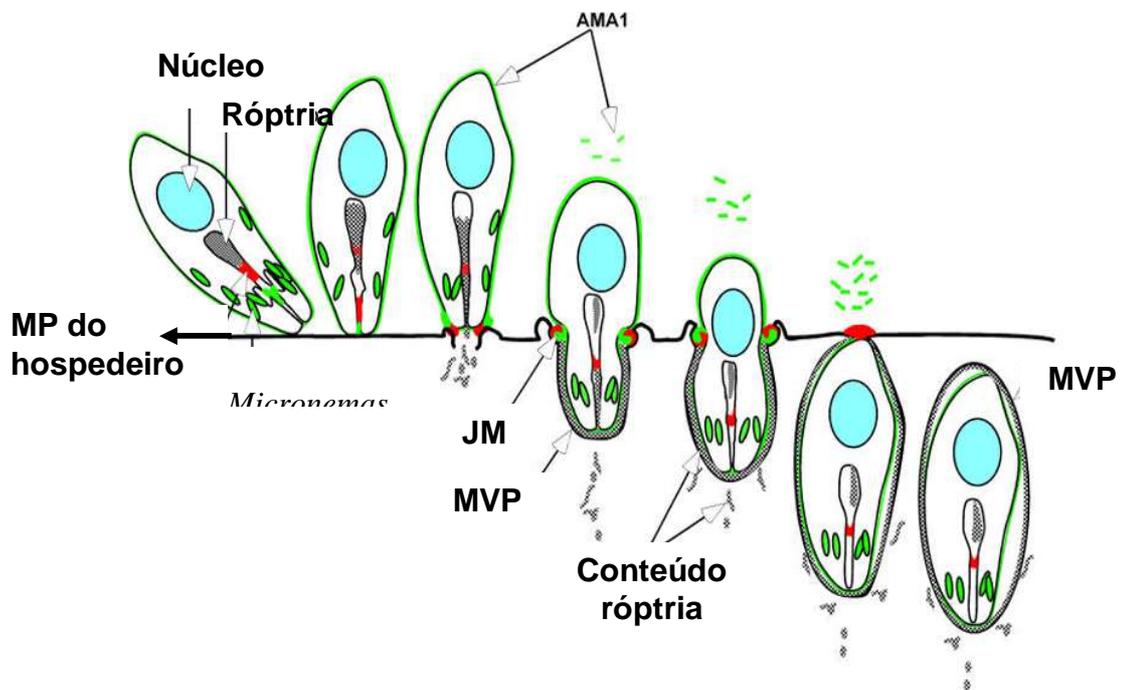
As proteínas adesivas dos micronemas em *T. gondii* (Wan e cols., 1997) em conjunto com outras proteínas, formam complexos adesivos que contém diversas moléculas semelhantes às integrinas, EGF, trombospondinas e lectinas que reconhecem receptores na superfície de diversas células, como heparan sulfato, proteoglicanas e lamininas (revisto em Tuckwell e Hamphries, 1993 e Haas e Plow, 1994). Cada complexo possui pelo menos uma proteína capaz de se ligar a receptores da célula alvo. Parte a destes complexos funcionaria na movimentação do parasito através das barreiras teciduais, enquanto outros estariam envolvidos na penetração dentro da célula hospedeira, possibilitando o reconhecimento pelo parasito de uma variedade maior de receptores e amplificando assim sua gama de hospedeiros (Carruthers, 2002).

Alexander e cols. (2005) descreveram a secreção coordenada das róptrias e micronemas durante o processo de invasão, identificando um complexo de quatro proteínas: TgAMA1, RON2, RON4 e a Ts4705. Pelo menos duas destas proteínas, a TgAMA1 e a RON4, interagem no processo de entrada, localizando-se em uma constricção denominada junção móvel (JM), uma estrutura em forma de anel, onde as

membranas do parasito e do hospedeiro ficam em íntimo contato (Alexander e cols., 2005) (Esquema 4).

O modelo mais aceito é que o parasito entre em contato com o citoesqueleto da célula hospedeira por esta JM, excluindo proteínas da membrana plasmática da mesma e dando início à formação da membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) (Mordue e cols., 1999; revisto em Boothroyd e Dubremetz, 2008).

A única circunstância em que as róptrias liberam seu conteúdo é durante o processo de invasão da célula hospedeira. Ainda não se sabe o que dispara tal secreção, mas evidentemente este processo é dependente de um reconhecimento direto entre a região apical do parasito e moléculas da célula hospedeira. Essas proteínas, uma vez secretadas, apresentam diversos destinos como: (i) localização na JM ou (ii) formação de vesículas no lúmen do VP.



(Modificado por Gomes (2006) de Alexander e cols., 2005)

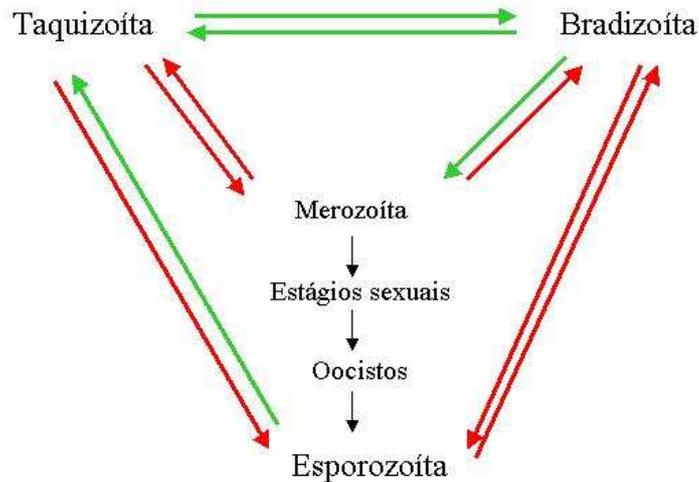
Esquema 4: Representação esquemática da invasão do *Toxoplasma*: destaque para a representação da junção móvel (JM) e da membrana do vacúolo parasitóforo (MVP). A proteína secretada pelos micronemas TgAMA1 (verde) é liberada na superfície da célula hospedeira, estabelecendo uma forte associação com a sua MP juntamente com a secreção da RON4 (vermelho). As RON4 constituintes das róptrias são detectáveis no vacúolo inicial já no interior da célula hospedeira. JM é então estabelecida e os micronemas cessam a secreção. As RON4 migram para a porção final posterior do parasito sob a forma de anel, juntamente com a constrição da JM e somente elas são encontradas no "ponto final" do estabelecimento da junção entre as membranas do vacúolo parasitóforo e da célula hospedeira.

5. Tropismo celular e estágio conversão do *Toxoplasma*

O *T. gondii* é reconhecido como um dos parasitos oportunistas mais comuns do sistema nervoso e das fibras musculares esqueléticas em indivíduos contaminados pelo vírus HIV (Luft & Remington, 1992; Gherardi e cols., 1992; Biggs e cols., 1995). Alguns autores consideram o *Toxoplasma* como um parasito neurotrófico, uma vez que encefalites severas são freqüentemente um sintoma clínico da doença (Dubey, 1997). No entanto, até o momento o tropismo celular dos taquizoítos não foi bem caracterizado *in vivo* (revisto em Boothroyd e Dubremetz, 2008). Por outro lado, em carneiros, ovelhas, porcos, cavalos e vacas, cistos teciduais são encontrados com mais freqüência na musculatura esquelética do que no tecido nervoso (Dubey, 1980b, 1982, 1983, 1984, 1985; Thorne & Sharma, 1980; Dubey, Murrel & Fayer, 1984; Dubey e cols., 1986). É provável que exista uma predileção por parte do parasito em formar cistos no músculo estriado (Guimarães e cols., 2008) e no sistema nervoso central, sendo estas células alvo na fase crônica da doença (Dubey e cols., 1998; Lüder e cols., 1999).

A diferenciação é um processo fundamental em organismos vivos, sendo essencial para organismos multicelulares e também comum em unicelulares, sendo neste caso um fenômeno temporal sempre associado a alterações no meio ambiente e envolvendo a passagem de um estágio para outro. No caso de parasitos protozoários, esta diferenciação é freqüentemente um processo obrigatório que distingue estágios no ciclo de vida, requerido para multiplicação, transmissão entre hospedeiros e sobrevivência nos mesmos (Dziersszinski, 2004).

A diferenciação das diversas formas infectivas durante o ciclo de vida do *Toxoplasma* está representada no Esquema 5. A diferenciação de formas taquizoítas para bradizoítas é fundamental para o desenvolvimento de cistos teciduais e o encistamento é um passo chave, que permite a manutenção do parasito dentro do hospedeiro por um longo período (Frenkel, 1973; Weiss e Kim, 2000).



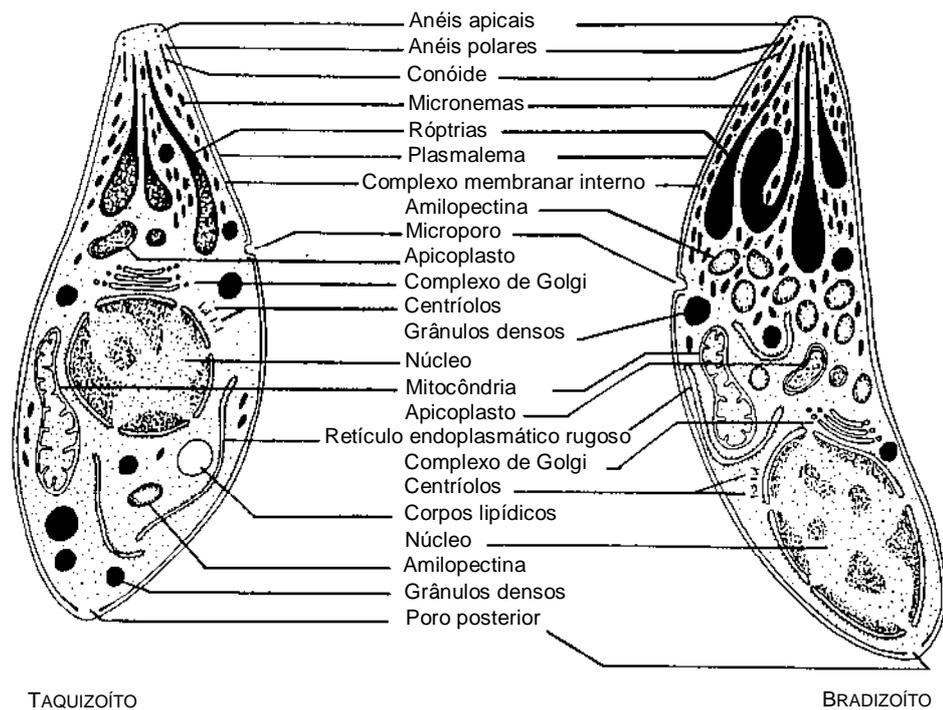
(Adaptado de Ferguson, 2004)

Esquema 5. Linhas possíveis de desenvolvimento e estágio diferenciação que podem ocorrer entre as diversas formas infectivas durante o ciclo de vida do *Toxoplasma*. As setas verdes mostram as possíveis conversões, enquanto as setas em vermelho, direções de conversões que não parecem ser possíveis.

Pouco se sabe sobre os mecanismos que levam ao encistamento tecidual ou sua reativação, apesar dos cistos serem de grande importância na fisiopatologia da toxoplasmose. Estudos *in vitro* têm sido desenvolvidos demonstrando a cistogênese em culturas celulares (Hoff e cols., 1977; Jones e cols., 1986; Dardé e cols., 1989; Lindsay e cols., 1991; McHugh e cols., 1993; Lindsay e cols., 1993; Ricard e cols., 1999; Guimarães, 2002). A maioria destes estudos tem sido realizada com linhagens celulares e utilizando condições de estresse que objetivam mimetizar a resposta imune do hospedeiro (Bohne, 1996), como pH alcalino, drogas, altas temperaturas (Bohne e cols., 1993, 1994, Soête e cols., 1994; Gross & Pohl, 1996, Ferreira-Da-Silva e cols., 2008) e possibilitam a análise da interconversão entre bradizoítos e taquizoítos (Soête e cols., 1993; Bohne e cols., 1994; Soête e cols., 1996; Lane cols., 1996; Guimarães e cols., 2008).

Há consideráveis mudanças no *Toxoplasma* durante o processo de estágio diferenciação, referente a: (i) alterações na superfície do parasito, (ii) alterações no metabolismo do parasito e (iii) indução de genes associados à resposta de estresse

(revisto em Bohne e cols., 1999). Os antígenos de superfície SAG1 e SAG2 desaparecem ao longo da diferenciação, não sendo muito clara a função biológica destas alterações na expressão de moléculas de superfície do parasito. A mudança da forma replicativa rápida dos taquizoítos, que requer alto consumo de energia, para bradizoítos que se multiplicam lentamente também é acompanhada por uma alteração no metabolismo do parasito, ocorrendo um armazenamento de energia sob forma de grânulos de amilopectina, numerosos em bradizoítos e muitas vezes ausentes em taquizoítos (revisto em Bohne e cols., 1999).



(Reproduzido e adaptado de Dubey e cols., 1998)

Esquema 6: **Comparação esquemática ultra-estrutural das formas taquizoítas (esquerda) e bradizoítas (direita).** Taquizoítos apresentam núcleo mais centralizado, róptrias esponjosas e pequeno número, ou mesmo ausência, de grânulos de amilopectina. Por outro lado, bradizoítos apresentam núcleo basal, róptrias mais eletrondensas e um grande número de grânulos de amilopectina.

6. A célula muscular esquelética

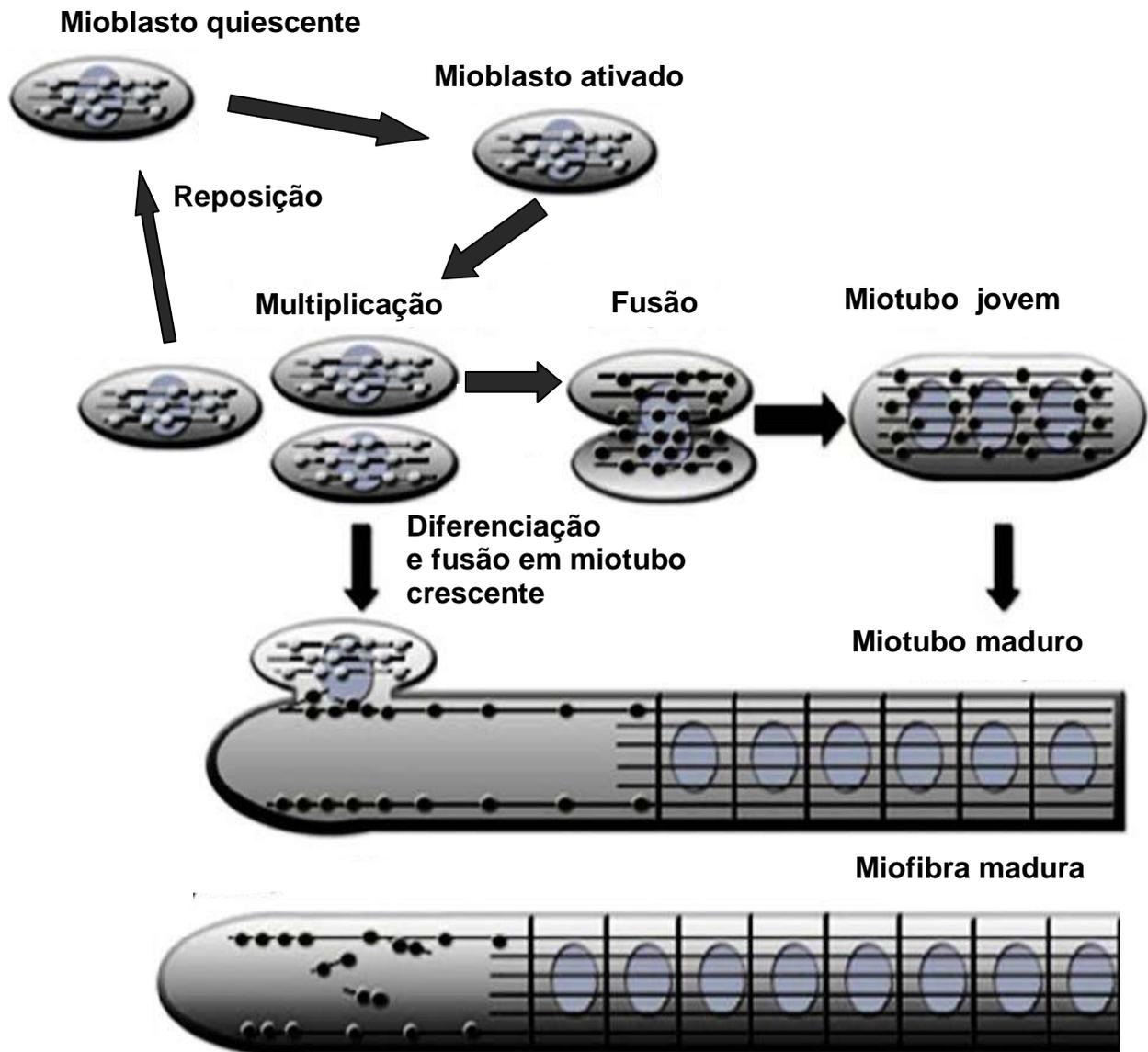
6.1. Biologia celular e molecular da miogênese

Os músculos esqueléticos são órgãos especializados na produção de força e que consistem em uma população heterogênea de células multinucleadas e miofibras estriadas envolvidas por um tecido conectivo (Willians e cols., 1989, Tortora e cols., 2003). As fibras musculares esqueléticas são células altamente diferenciadas, formadas em várias regiões do corpo, tendo como precursor celular os mioblastos (Buckingham, 1994). Estes se fundem e formam longos e multinucleados miotubos, que se organizam em miofibras (Esquema 7) produzindo proteínas músculo-específicas, envolvidas com a organização de organelas e da membrana plasmática dos mioblastos (Lu e cols., 2001). O músculo esquelético é altamente vascularizado com o objetivo de fornecer os nutrientes essenciais para as funções musculares (revisto em Sophie e cols., 2003).

Um grupo de fatores transcricionais, os chamados fatores reguladores miogênicos (MRFs), são críticos para a determinação e diferenciação terminal do músculo esquelético. Os MRFs são a MyoD1 (diferenciação miogênica 1), Myf5 (fator miogênico 5), miogenina e MRF4 (também conhecido como *Myf6*, fator miogênico 6), que juntos com proteínas da família MEF2 coordenam a expressão de genes durante a miogênese. Cada um desses genes regula a expressão do outro. Em aves, o primeiro gene a ser expresso em células precursoras é o *myoD*, seguida da expressão de *myf-5*. No entanto, em mamíferos, ocorre o contrário, sendo a expressão de *myf-5* anterior a expressão de *myoD* (Pownall e cols., 2002; revisto em Berkes e Tapscott, 2005). Estes fatores reguladores juntamente com outros, denominados estimuladores (fatores de crescimento), ativam a migração celular e o programa de diferenciação (Esquema 5) através da indução da transcrição de genes músculo-específicos, tanto regulatórios quanto estruturais (Buckingham e cols., 2003).

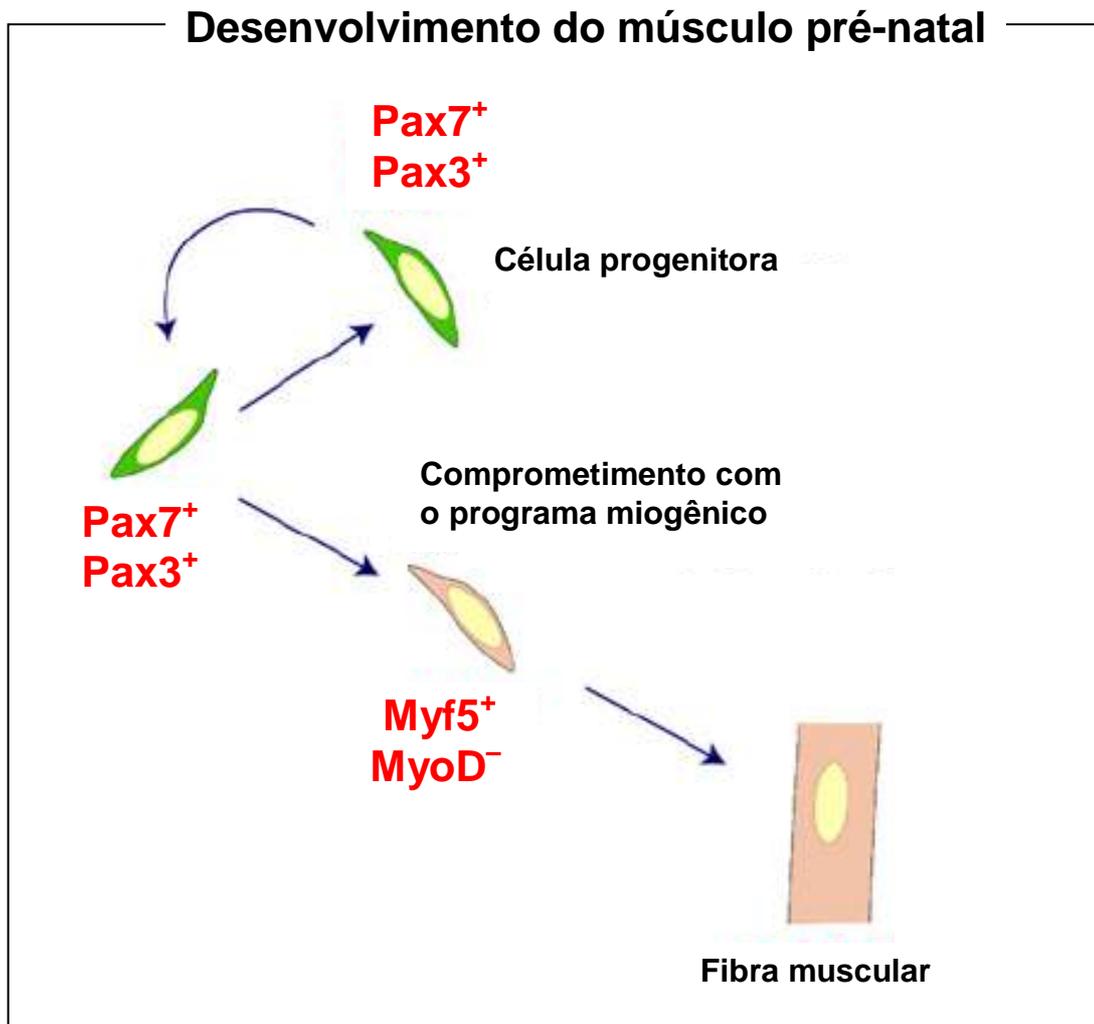
A expressão de MyoD e Myf5 é uma etapa fundamental e resulta no comprometimento de células do somito em linhagens miogênicas, enquanto a

miogenina desempenha importante papel na diferenciação de mioblastos (revisado por Berkes e Tapscott, 2005) (Esquema 8).



Modificado de Sanger e cols., 2006.

Esquema 7: Miogênese: Desenvolvimento inicial do músculo esquelético a partir de células mioblastos que após ativação, multiplicam-se e fusionam-se dando origem a miotubos jovens. Miócitos (mioblastos aptos à fusão) continuam se fusionando ao miotubo inicial, formando miotubos maduros e posteriormente miofibras.



(Modificado de Buckingham, 2007)

Esquema 8: Representação esquemática da miogênese em embriões. Direcionamento de progenitores da célula muscular esquelética no programa miogênico com expressão de Myf5 e MyoD, genes de determinação miogênica.

6.2. Cultura Primária de Células Musculares Esqueléticas

O cultivo primário de células musculares esqueléticas em monocamadas foi iniciado no início da década de 60 utilizando embriões de pinto (Konigsberg, 1963; revisto em Yaffe, 1973). Células musculares esqueléticas podem ser cultivadas a partir de uma grande variedade de espécies de insetos, aves e de mamíferos. Culturas primárias de tecidos embrionários são obtidas por dissociações mecânicas, enzimáticas ou pela conjugação de ambas as técnicas (Konigsberg e cols., 1978) e

cultivadas em meio suplementado com soro (soro de cavalo, fetal bovino, extrato embrionário). Esses agentes são indutores da atividade mitótica, facilitam a adesão celular às superfícies e são estimuladores da fusão de membranas (De Haan, 1965; De Lucca, 1966). A adição de cálcio no meio de cultura é fundamental para o início do processo de fusão celular (Shainberg e cols., 1969).

Durante a dissociação enzimática do tecido muscular, são isolados pelo menos três tipos celulares mononucleados: fibroblastos, mioblastos e miofibroblastos. Algumas manobras são utilizadas ao longo do cultivo objetivando enriquecer a população de mioblastos e diminuir a de fibroblastos. A seqüência de eventos morfofuncionais característicos da miogênese esquelética é: mioblastos, mioblastos competentes para fusão (miócitos), miotubos jovens, miotubos maduros e miofibra (revisto em Inestrosa, 1982). O músculo diferenciado é caracterizado pela presença de células multinucleadas não divisíveis (miotubos e miofibras) formadas pela fusão dos mioblastos. Tem sido demonstrado que a fusão é dependente da composição do meio e da densidade celular (Linkhart e cols., 1981), ocorrendo num período de 5-6 h após o plaqueamento e somente entre os mioblastos que já tenham passado pelas mudanças específicas do desenvolvimento, *in vitro*.

Linhagens celulares de mioblastos têm sido obtidas a partir de tecido muscular de rato (L6 e L8) e camundongo (C12). Esses mioblastos, após um período de multiplicação *in vitro* requerem uma mudança de concentração de soro em seu meio e para que ocorra o disparo da diferenciação miogênica e conseqüente formação de miotubos (Yaffe, 1968; Yaffe e Saxel, 1977).

A escolha do modelo de células musculares esqueléticas (CME), proposto por nosso grupo durante o estudo da interação do *T. gondii*-célula hospedeira (Monteiro-Leal e cols., 1998; Andrade e cols., 1998; Andrade e cols., 1999; Barbosa e cols., 1998, 1999, 2000; Andrade e cols., 2001; Barbosa e cols., 2001; Guimarães, 2002; Rodrigues e cols., 2001; Barbosa e cols., 2005; Guimarães e cols., 2008) e utilizado na presente tese, baseia-se em dados iniciais *in vivo*, os quais demonstraram que a cistogênese é prevalente nos tecidos neurais e musculares, tanto cardíaco quanto esquelético (Jacobs, 1967; Mehlhorn e Frenkel, 1980; Dubey, 1988; Frenkel, 1990). Além disso, esta escolha se justifica: (i) pela importância das CME como uma das células alvo, onde o parasito se aloja durante a fase crônica da doença, havendo evidências do isolamento de cistos em necrópsias de músculo esquelético em humanos (Remington & Cavanaugh, 1965), (ii) pelos relatos de toxoplasmose muscular em pacientes com HIV demonstrando por técnicas de

imunocitoquímica e microscopia eletrônica a presença do parasito nesse tecido (Gherardi e cols., 1992); (iii) por considerarmos que a caracterização e a identificação de moléculas presentes na superfície de células transformadas e seu comportamento frente ao parasito, podem não refletir as mesmas interações moleculares que ocorrem naturalmente durante o desenvolvimento da doença, *in vivo*; (iv) pelos nossos recentes resultados, demonstrando a ocorrência de cistogênese espontânea na célula muscular esquelética, possibilitando uma análise molecular da conversão de bradizoítos e reativação de cistos, sem a interferência de agentes químicos ou físicos (Guimarães e cols., 2002; Guimarães e cols., 2008), (v) pelo músculo infectado representar uma das principais vias de transmissão da infecção nos humanos, durante a ingestão de carne crua ou mal cozida.

OBJETIVOS

II OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Estudar a conversão taquizoíta-bradizoíta durante a interação de *T. gondii* em células musculares esqueléticas e em linhagens celulares.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1. Estabelecer a miogênese de culturas primárias de CME *in vitro*, analisando a expressão gênica de proteínas músculo específico;
- 2.2. Monitorar comparativamente a conversão de taquizoítos para bradizoítos de *T. gondii* em CME e em linhagens celulares de músculo e de fibroblastos;
- 2.3. Analisar a transcrição gênica de bradizoítos durante a infecção de *T. gondii* em CME através de ensaios por qRT-PCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

III Materiais e métodos

Todos os experimentos foram executados de acordo com as Normas de Segurança estabelecidas pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da FIOCRUZ, resolução 242/99, licença sob o número 0229-04 e pelas Normas Internacionais dos cuidados na manipulação de animais e agentes infecciosos.

1. Isolamento e cultura de células musculares esqueléticas (Barbosa e cols., 2000).

Fêmeas de camundongos NMRI grávidas com 18 a 20 dias de gestação foram eutanasiadas por deslocamento cervical e em câmara mortuária contendo CO₂, seguido dos procedimentos cirúrgicos.

As fêmeas foram colocadas em posição ventral, o abdômen aberto e exposto o útero contendo os embriões que foram retirados com auxílio de pinças e tesouras estéreis e mantidos em solução de Ringer (154 mM NaCl, 56 mM KCL, 17 mM Na₂HPO₄ em solução aquosa) no gelo. Em seguida, as coxas dos embriões foram retiradas e a pele que envolvia o membro posterior, assim como o tecido ósseo e o cartilaginoso, foram separados do material muscular de interesse.

Os músculos isolados foram transferidos para uma nova placa estéril descartável contendo solução de Ringer. O tecido muscular foi fragmentado (~ 5 mm³) com auxílio de um bisturi e mantido em solução de Ringer e no gelo. Os fragmentos foram transferidos para um Erlenmeyer de 50 ml contendo Ringer e os músculos foram dissociados enzimática e mecanicamente de 5 a 7 vezes, 5 minutos cada, em solução de PBS contendo 0,05% tripsina e 0,01% EDTA. A cada dissociação, uma alíquota da solução foi monitorada ao microscópio óptico, objetivando avaliar o efeito da tripsinização sobre o tecido, o número de células isoladas, sua refringência e viabilidade celular.

A dissociação do tecido foi interrompida pela adição de 10% soro fetal bovino em meio modificado Dulbecco (DMEM) a 4°C. A solução contendo células isoladas foi centrifugada e ressuspensa em meio com 15% de soro de cavalo, 2% de soro fetal bovino, 1 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina. As células foram plaqueadas em garrafa de cultivo celular, incubadas por 30 min a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A seguir foi utilizado o plaqueamento seqüencial, visando diminuir o número de fibroblastos do pool final de células e enriquecer a

cultura de mioblastos. Esta manobra se baseia no fato de que os fibroblastos apresentam uma velocidade de adesão ao substrato mais rápida do que os mioblastos, facilitando então, a purificação da cultura. Após 30 min, o sobrenadante rico em mioblastos foi recolhido e centrifugado novamente e cultivado em placas. Para análise das amostras por imunofluorescência 3×10^4 mioblastos foram cultivados em placas de 24 poços, enquanto para os ensaios de extração de RNA, 10×10^4 /poço de mioblastos foram cultivados em placas de 6 poços.

Visando manter as células bem aderidas às superfícies de cultivo e a obtenção de culturas de longo termo, as superfícies plaqueadas foram previamente revestidas "overnight" com 0,5 mg/ml poli-ornitina em solução de 150 mM tampão borato de sódio, pH 8,3 e então revestidas com 15 µg/ml de laminina em PBS por pelo menos 6 horas. As culturas foram mantidas a 37°C por 4-5 dias para permitir a miogênese.

2. Manutenção e diferenciação de linhagem de mioblasto de rato (L6.C10)

A linhagem de mioblasto de rato L6.C10 foi obtida da Coleção Européia de Culturas de Células Animais (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, UK). Os mioblastos foram mantidos subconfluentes cultivando 2×10^5 células em garrafas de 75 cm³ em DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos.

Quatro diferentes meios foram testados para analisar a capacidade de indução miogênica da linhagem de mioblastos (processo de fusão e formação de miotubos): (i) DMEM; (ii) DMEM + 2% SFB; (iii) DMEM + 2% soro de cavalo e, (iv) DMEM + 10% SFB. As culturas foram analisadas ao longo do tempo, com início após as primeiras 24 h de cultivo celular até o 10º dia de plaqueamento, monitoradas ao microscópio de contraste de fase considerando-se a evolução da diferenciação miogênica. As imagens foram capturadas utilizando o programa Axion Vision 4.5 (Zeiss).

3. Cultura de linhagem de fibroblasto de camundongo (L929)

Fibroblastos de camundongo da linhagem L929 foram mantidos regularmente em placas de 6 poços e cultivados em DMEM contendo 10% SFB, 1 mM de piruvato de sódio, aminoácidos não essenciais, penicilina e estreptomicina. As células foram

plaqueadas em placas de 24 poços para realização dos ensaios de estágio-conversão.

4. Cultivo do *Toxoplasma* e infecção das células

Taquizoítos da cepa NTE avirulenta tipo II de *T. gondii* foram mantidos em células L929 como células hospedeiras. A co-cultura foi cultivada em meio RPMI contendo 1% SFB e 1% de antibiótico, e os parasitos foram coletados logo após a iniciação do processo de lise dos fibroblastos. Para infecção das células musculares e dos fibroblastos, o sobrenadante das culturas de células L929 rico em taquizoítos foi coletado e centrifugado a 35 × g por 5 min para isolar possíveis debris celulares. O sobrenadante foi então centrifugado a 1350 × g por 10 min, ressuspenso em meio DMEM suplementado com 10% SFB e 1% de estreptomicina/ penicilina.

Cultura primária de células musculares esqueléticas, cultura de linhagem de mioblasto L6.C10 e os fibroblastos foram infectados com taquizoítos de *T. gondii* numa razão parasita-célula hospedeira de 1:1 e mantidos em seus respectivos meios de cultura.

5. Ensaios de imunofluorescência

5.1. Monitoramento da diferenciação das células musculares *in vitro*

Com o objetivo de identificar proteínas músculo específicas e a formação de miotubos multinucleados ao longo do processo de diferenciação muscular *in vitro*, células musculares esqueléticas foram cultivadas em lamínulas de vidro, previamente revestidas por laminina, e fixadas por 5 minutos com uma solução de 4% paraformaldeído em 0.1 M de solução tampão cacodilato de sódio após 1, 2, 4 e 6 dias de cultivo. Em seguida, as culturas foram lavadas por 10 min em solução 50 mM NH₄Cl em PBS, pH 7,4 e permeabilizadas com 0,1 mg/ml saponina em PBS contendo 1% albumina bovina de soro (BSA) 3 vezes por 10 min. As células foram incubadas com 2 e 5 µg/ml de anticorpo anti-desmina e anti-MyoD (BD Biosciences, Heidelberg, Alemanha) por 1 h a 25°C ou então ou “o vernight” a 4°C, lavadas 3x novamente com solução de 0,1 mg/ml saponina em PBS e então incubada com anticorpo secundário Cy3. As lamínulas contendo monocamada de células musculares foram montadas em 10 µl/ml Mowiol e analisadas com um microscópio

confocal a laser (Modelo TCS SP2, Leica, Heidelberg). Controles negativos foram realizados para cada um dos marcadores.

5.2. Monitoramento da diferenciação dos parasitos *in vitro*

Visando acompanhar a estágio conversão de taquizoítos em bradizoítos ao longo de uma cinética, células infectadas com *T. gondii* foram fixadas com uma solução de 4% paraformaldeído em 0,1 M de solução tampão cacodilato de sódio. As células foram lavadas por 10 min em solução de 50 mM NH₄Cl em PBS, pH 7,4 e então permeabilizadas por 1 h em solução de PBS contendo 0,1 mg/ml saponina e 1% albumina de soro bovino (BSA). Após esta etapa, as células foram incubadas simultaneamente com o anticorpo monoclonal CC2 produzido em rato, que reconhece bradizoítos (Gross e cols., 1995) e com um anticorpo policlonal anti-*Toxoplasma* feito em coelho, por 1 hora. Em seguida as células foram lavadas 3x novamente com solução de 0,1 mg/ml saponina em PBS e incubadas simultaneamente com o anticorpo secundário Cy2 anti-rato e Cy3 anti-coelho. As monocamadas de células foram montadas em Mowiol, analisadas por um microscópio confocal de varredura a laser e o percentual de vacúolos contendo bradizoítos foi determinado contando-se aleatoriamente 100 vacúolos parasitóforos por lamínula em um microscópio de fluorescência (Modelo DM R, Leica, Heidelberg).

6. Análises por PCR quantitativo e semiquantitativo (q RT-PCR)

6.1. Da expressão genes-músculo específicos

Com o objetivo de determinar a diferenciação miogênica das células musculares esqueléticas *in vitro*, o RNA de total de culturas primárias de músculo esquelético foi isolado após 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10 dias de cultivo. Dez nanogramas de cDNA por amostra foram usados como “template” para realização do PCR semi quantitativo (Termociclador modelo T3, Biometra, Göttingen), utilizando os pares de primers músculo-específico para Myf-5 e MyoD, e β actina como *house keeping gene*, listados na Tabela 1. Cada produto de PCR foi misturado a um tampão de corrida (98% formamida, 10mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol e 0,05%xilenocianol), separado em gel em 1% agarose e visualizados utilizando brometo de etídio. Em todas as reações de PCR foram utilizados controle negativo, constituído por todos os reagentes presentes na reação e isento de DNA.

6.2. De genes-estágio específico do *Toxoplasma*

Para análise da expressão de genes estágio-específicos do *Toxoplasma*, RNA total foi isolado das culturas infectadas utilizando o kit GenElute Miniprep (Sigma, Deisenhofen, Alemanha). Após transcrição reversa, diluições seriadas de cDNA foram amplificadas por PCR quantitativo em tempo real em um LightCycler com SYBR Green FastStart DNA Master^{Plus} (Roche, Mannheim, Alemanha) utilizando os primers específicos de *T. gondii*, ENO2 e ENO1, e α tubulina como *house keeping gene*. Em todas as reações de PCR foram utilizados controle negativo, constituído por todos os reagentes presentes na reação e isento de DNA.

Os dados foram analisados utilizando-se o programa REST-MCS 2006 (Pfaffl e cols., 2002). A expressão relativa dos genes foi calculada entre as cinéticas de 4 h de infecção (controle) e 1 dia, 2, 4 e 6 dias após infecção (amostras), utilizando a seguinte fórmula matemática:

$$\text{Razão} = (E_{\text{gene alvo}})^{\Delta\text{CPalvo}(\text{controle-amostra})} / (E_{\text{gene de referência}})^{\Delta\text{CPref}(\text{controle-amostra})}$$

onde, o gene de referência foi o gene para tubulina e os genes alvos foram o ENO1 (bradizoíto específico) e o ENO2 (taquizoíto específico). ΔC é referente aos valores de “crossing point” dos tempos 1, 2, 4 e 6 dias após infecção (amostras) em relação ao tempo de 4 h (controle).

TABELA 1: Tabela de seqüências de “primers”

GENES	SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS
α tubulina forward	5'-CGCCACGGCCGCTACCTGACT-3';
α tubulina reverse	5'-TACGCGCCTTCCTCTGCACCC -3'
ENO2 forward	5'-AGCGGCGCATCCACTGGCATCTAC-3';
ENO2 reverse	5'-AACGGGACGGGCATTACCATCTTG-3';
ENO1 forward	5'-CGAGGGGTGGCTGAAAAAGTATCC-3';
ENO1 reverse	5'-CAGCGAAGGCCACGACAAG-3'.
Myf5 forward	5'-TGAGGGAACAGGTGGAGAAC-3'
Myf5 reverse	5'-AGCTGGACACGGAGCTTTTA-3'
MyoD1 forward	5'-TACCCAAGGTGGAGATCCTG-3'
MyoD1 reverse	5'-CATCATGCCATCAGAGCAGT-3'
β actina forward	5'-GATGACCCAGATCATGTTTGAGAC-3'
β actina reverse	5'-TGCTCGAAGTCTAGAGCAACATAG-3'

7. Estágio conversão do *Toxoplasma* induzido por estresse exógeno

7.1. Indução da estágio conversão por aumento do pH e ausência de CO₂

CMEs e linhagem de mioblasto de rato (L6.C10) foram cultivadas em placas de 24 poços, infectadas numa relação 1:1 célula hospedeira-parasita e mantidas em meio de diferenciação para *toxoplasma*, em meio ajustado para pH 8,1, pH 7,8 e pH 7,6 (utilizando pHmetro Modelo 766, Calimatic, Knick, Berlin). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C na ausência de CO₂ e após 24 e 48 h de interação foram fixadas por 5 minutos com uma solução de 4% paraformaldeído em 0.1 M de solução tampão cacodilato de sódio após 1, 2, 4 e 6 dias de cultivo. As culturas foram lavadas por 10 min em solução 50 mM NH₄Cl em PBS, pH 7,4 e permeabilizadas com 0,1 mg/ml saponina em PBS contendo 1% BSA 3 vezes por 10 min. Após esta etapa, as células foram incubadas simultaneamente com o anticorpo monoclonal CC2 produzido em rato, que reconhece bradizoítos (Gross e cols., 1995) e com um anticorpo policlonal anti-*Toxoplasma* feito em coelho, por 1 hora. Em seguida as células foram lavadas novamente 3 vezes com solução de 0,1 mg/ml saponina em PBS e incubadas simultaneamente com o anticorpo secundário Cy2 anti-rato e Cy3 anti-coelho, montadas em 10 µl/ml Mowiol e analisadas com um microscópio confocal a laser (Modelo TCS SP2, Leica, Heidelberg).

7.2. Indução do estágio conversão com IFN gama em presença de LPS

Para o estudo da ação de citocinas na indução da diferenciação do *Toxoplasma*, CMEs foram infectadas e mantidas em meio de cultura contendo 100U/ml IFN-gama em presença de 1 µg/ml. As culturas foram infectadas numa relação 1:1 (célula hospedeira-parasita), fixadas após 4 h, 1, 2, 4 e 6 dpi, lavadas por 10 min em solução 50 mM NH₄Cl em PBS, pH 7,4 e permeabilizadas com 0,1 mg/ml saponina em PBS contendo 1% BSA 3 vezes por 10 min. Em seguida, as células foram processadas como descrito anteriormente: incubadas simultaneamente com o anticorpo monoclonal CC2 produzido em rato, que reconhece bradizoítos (Gross e cols., 1995) e com um anticorpo policlonal anti-*Toxoplasma* feito em coelho, por 1 hora, lavadas novamente 3 vezes com solução de 0,1 mg/ml saponina em PBS e incubadas simultaneamente com o anticorpo secundário Cy2 anti-rato e Cy3 anti-coelho, montadas em 10 µl/ml Mowiol e

analisadas com um microscópio confocal a laser (Modelo TCS SP2, Leica, Heidelberg).

RESULTADOS

IV. Resultados

1. Estabelecimento da miogênese de culturas primárias de CME.

1.1. Após análise por microscopia de contraste de fase

A diferenciação miogênica de mioblastos obtidos de embriões de camundongos NMRI foi observada após o cultivo das células em meio condicionado para cultura primária de células musculares. O referido meio tem a suplementação de 15% de soro de cavalo e 2% soro fetal bovino, induzindo alterações morfológicas características da diferenciação, reveladas por microscopia de contraste de fase (Fig. 1a-b). Inicialmente (2-3 dias), observa-se a adesão das células ao substrato e um alto percentual de células bipolares, típica morfologia de mioblastos (Fig. 1a-b). Neste período é evidente a atividade proliferativa dos mioblastos (Fig. 1b). Com o aumento do número de células, após 3-4 dias há alinhamento progressivo dos mioblastos, tendo início a fusão de miócitos, com a formação de miotubos jovens contendo 2-3 núcleos (Fig. 2a). A figura 2b mostra miotubos maduros, multinucleados, de diversos tamanhos e calibres dispostos paralelamente, após 6-7 dias de cultivo. Além disso, contrações espontâneas dos sincícios foram regularmente observadas e documentadas por vídeomicroscopia.

1.2. Por microscopia de fluorescência

O monitoramento da expressão da gênica de MyoD (proteína específica do músculo) permitiu observar marcação positiva logo após 24 h de plaqueamento, estando presente no núcleo de células mononucleadas (Fig. 3a). A expressão de desmina foi visualizada em células ainda arredondadas no mesmo período de cultivo, distribuída na periferia das células e em torno do núcleo (Fig. 3b). A diferenciação miogênica plena (4-5 dias) foi observada pela presença de múltiplos miotubos maduros com 10-20 núcleos por sincício apresentando uma forte reação nos núcleos para o fator de transcrição MyoD (Fig. 3c). Culturas após 4-5 dias de plaqueamento, expressavam desmina em seu citoplasma com maior concentração nas extremidades das células e em torno do núcleo (Fig. 3d).

1.3. Monitoramento da expressão gênica de proteínas músculo específico de culturas primárias de CME por RT-PCR.

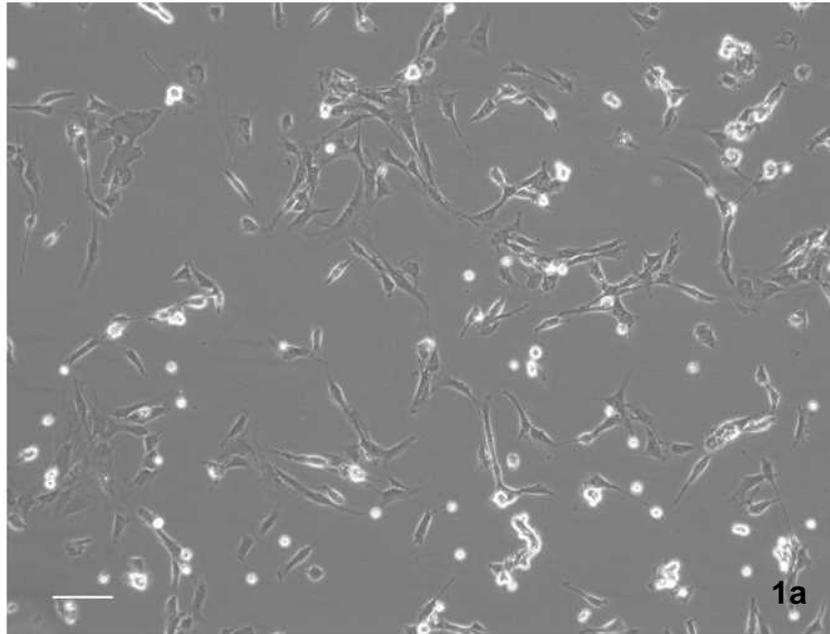
A análise por RT-PCR de RNA total de culturas primárias mostrou a cinética da expressão de genes específicos que desempenham um papel crucial na

Figura 1: Imagens de culturas de células musculares por microscopia de contraste de fase mostrando estágios iniciais da miogênese.

A: CME após 2 dias de plaqueamento nota-se o espalhamento dos mioblastos, adquirindo a forma bipolar e início de alinhamento celular. Barra: 100 μ m

B: Após 3 dias de cultivo observa-se o processo de adesão dos mioblastos ao substrato, intensa atividade proliferativa dos mioblastos e início de fusão dos miócitos. Barra: 200 μ m

2 dias



4 dias

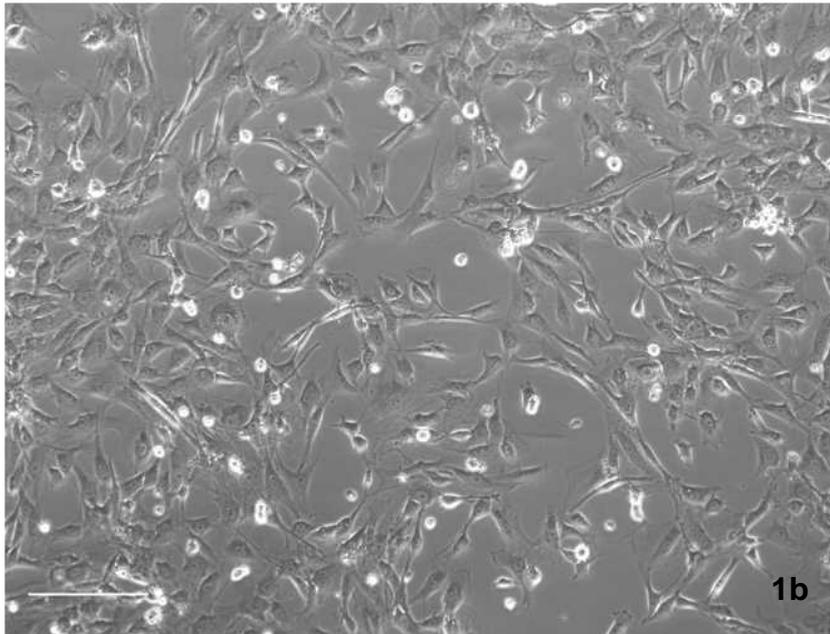


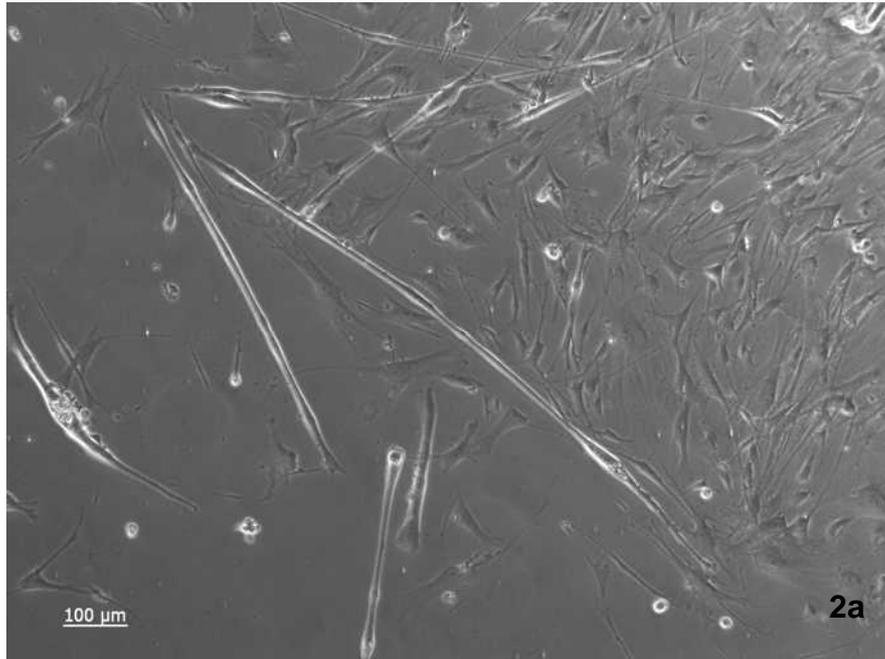
Figura 1

Figura 2: Imagens de culturas de células musculares por microscopia de contraste de fase mostrando a miogênese.

A: Diferentes aspectos da cultura mostrando no quadrante superior direito uma monocamada de células alinhadas e no quadrante central células diferenciadas formando miotubos jovens (2-3 núcleos). Barra: 100 μ m

B: Cultura muscular de longo termo, altamente diferenciada, mostrando vários feixes de miotubos paralelos e organizados. Barra: 200 μ m

5 dias



7 dias

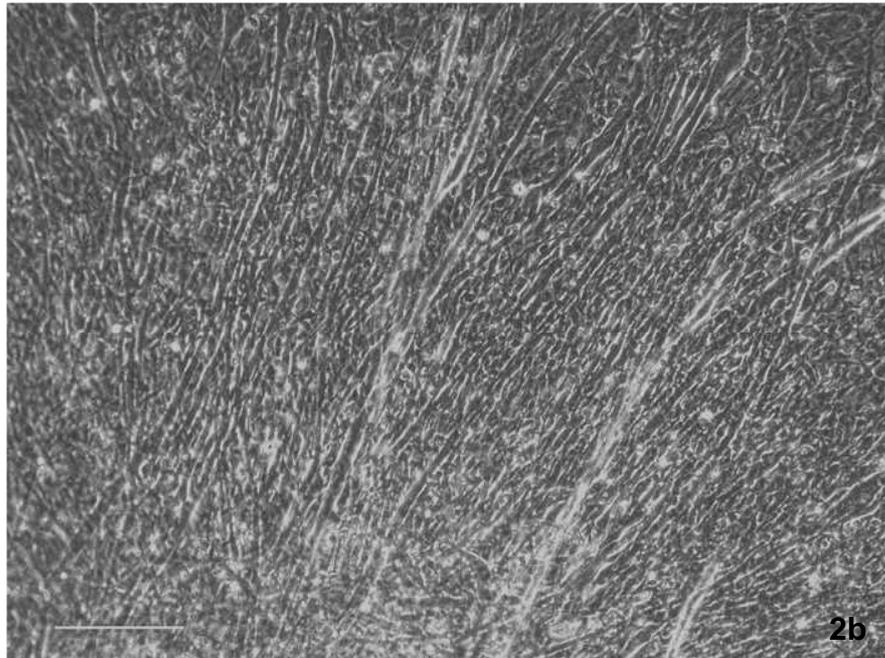


Figura 2

Figura 3: Culturas de células musculares expressando MyoD e desmina proteínas-músculo-específicas ao longo da miogênese, por microscopia confocal a laser.

A: Reação positiva para MyoD logo após 24 h de plaqueamento, estando presente no núcleo de células mononucleadas.

B: Reação positiva para desmina visualizada em células ainda arredondadas, no mesmo período de cultivo, distribuída na periferia das células e em torno do núcleo.

C: Diferenciação miogênica plena (4-5 dias) observada pela presença de múltiplos miotubos maduros com 10-20 núcleos por sincício apresentando uma forte reação nos núcleos para o fator de transcrição MyoD.

D: Expressão de desmina após 4-5 dias de plaqueamento, no citoplasma de CME, mostrando uma maior concentração nas extremidades das células e em torno do núcleo.

E: Controle negativo da reação para MyOD.

F: Controle negativo da reação para desmina.

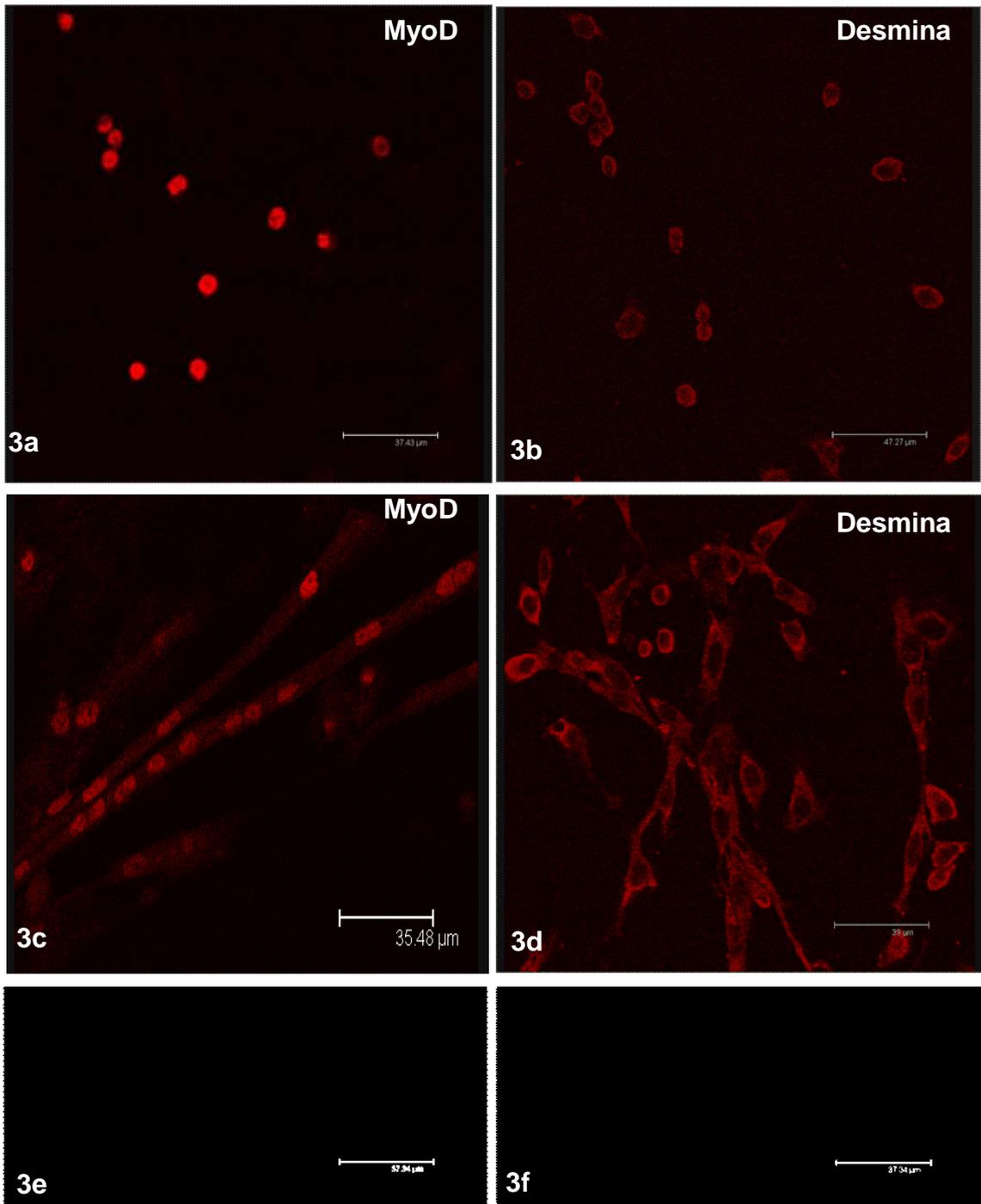


Figura 3

diferenciação de mioblastos a miotubos. Myf5 foi expresso após 2 dias de cultivo celular até 10 dias de monitoramento (Fig. 4). A expressão de MyoD foi mais acentuada entre os dias 5 e 6 dias com concomitante baixa regulação de Myf5 durante a miogenese, indicando claramente que o sistema estabelecido *in vitro* de diferenciação de células musculares esqueléticas foi estabelecido com sucesso (Fig. 4). A expressão gênica da proteína β -actina foi utilizada como padrão (controle interno) e se mostrou constante ao longo do 10 dias de análise (Fig. 4).

2. Estágio conversão taquizoíta-bradizoíta de *T. gondii* em CME

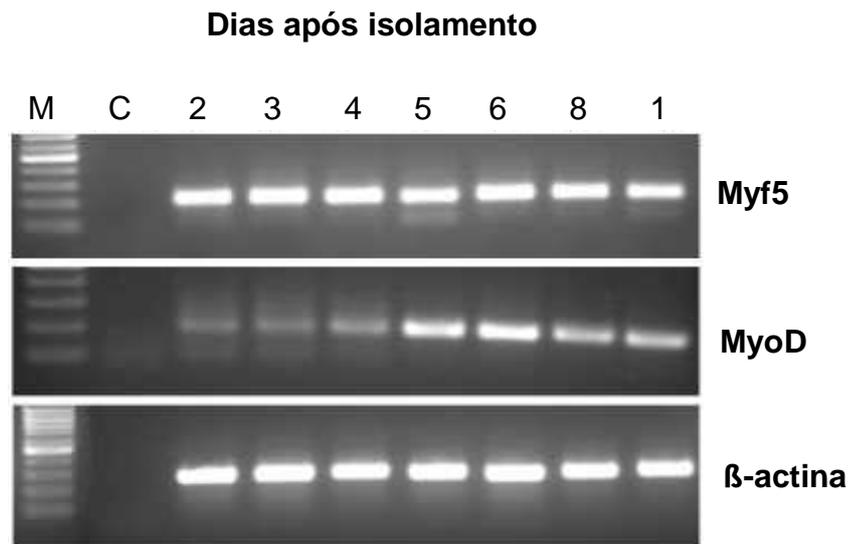
2.1 Monitoramento da conversão do *Toxoplasma* por imunofluorescência

A infecção de células musculares esqueléticas com taquizoítos de *T. gondii*, seu desenvolvimento intracelular e sua diferenciação foram monitorados a partir de 4h até o 6° dia pós-infecção. A análise foi feita por imunofluorescência indireta utilizando-se anticorpos antitoxoplasma (reconhece taquizoítos) e anti-CC2 (bradizoítos específicos). *T. gondii* se mostrou capaz de infectar as células musculares esqueléticas, a julgar pela presença de parasitos intracelulares após 4 h de infecção (Fig. 5a-c) e sua replicação foi observada ao longo das 24 h iniciais (Fig. 5d-f). No ponto inicial da infecção, os parasitos não reagiram com o anticorpo CC2 que marcam especificamente vacúolos parasitóforos contendo bradizoítos, mas não taquizoítos (Fig. 5a). A incubação das células com o anticorpo policlonal anti-*Toxoplasma* mostrou taquizoítos fortemente positivos (Fig. 5b). De forma notável, após 24 h de infecção, múltiplos vacúolos contendo *Toxoplasma* foram reativos para o anticorpo CC2 (Fig. 5d) indicando desse modo, o início da estágio conversão para bradizoíta (Fig. 5d-f).

Após 24 h de infecção foram observados vacúolos parasitóforos adjacentes a vacúolos contendo bradizoítos que não apresentavam qualquer reação e outros pouco reativos ao anticorpo anti-CC2 (Fig. 5e-f). Este fato mostrou que estágio-conversão de *T. gondii* dentro de uma mesma célula hospedeira é um processo não sincronizado. Mais surpreendentemente, uma reação heterogênea ao CC2 também foi observada dentro de um único vacúolo parasitóforo (VP) indicando que a cinética de estágio conversão também não é sincrônica no micro-ambiente da matriz vacuolar (Fig. 5g-i).

Dois dias após a infecção, a divisão dos parasitos foi mantida e vacúolos contendo 4 a 16 parasitas foram detectados dentro das células musculares

Figura 4: Análise da expressão dos genes myf5 e myoD por PCR semiquantitativo. Visualização por eletroforese dos produtos de PCR separados em gel de agarose e visualizados pelo brometo de etídeo. Expressão de marcadores específicos para célula muscular foram observados desde o 2º dia de cultivo celular até o 10º dia, indicando claramente que o sistema *in vitro* de diferenciação de células musculares esqueléticas foi estabelecido com sucesso. Atenção para a expressão de myf5 prévia a de myoD, característico do programa miogênico em mamíferos. M (marcador de 100pb) e β -actina como house keeping gene. Controle negativo (CN).



Figura

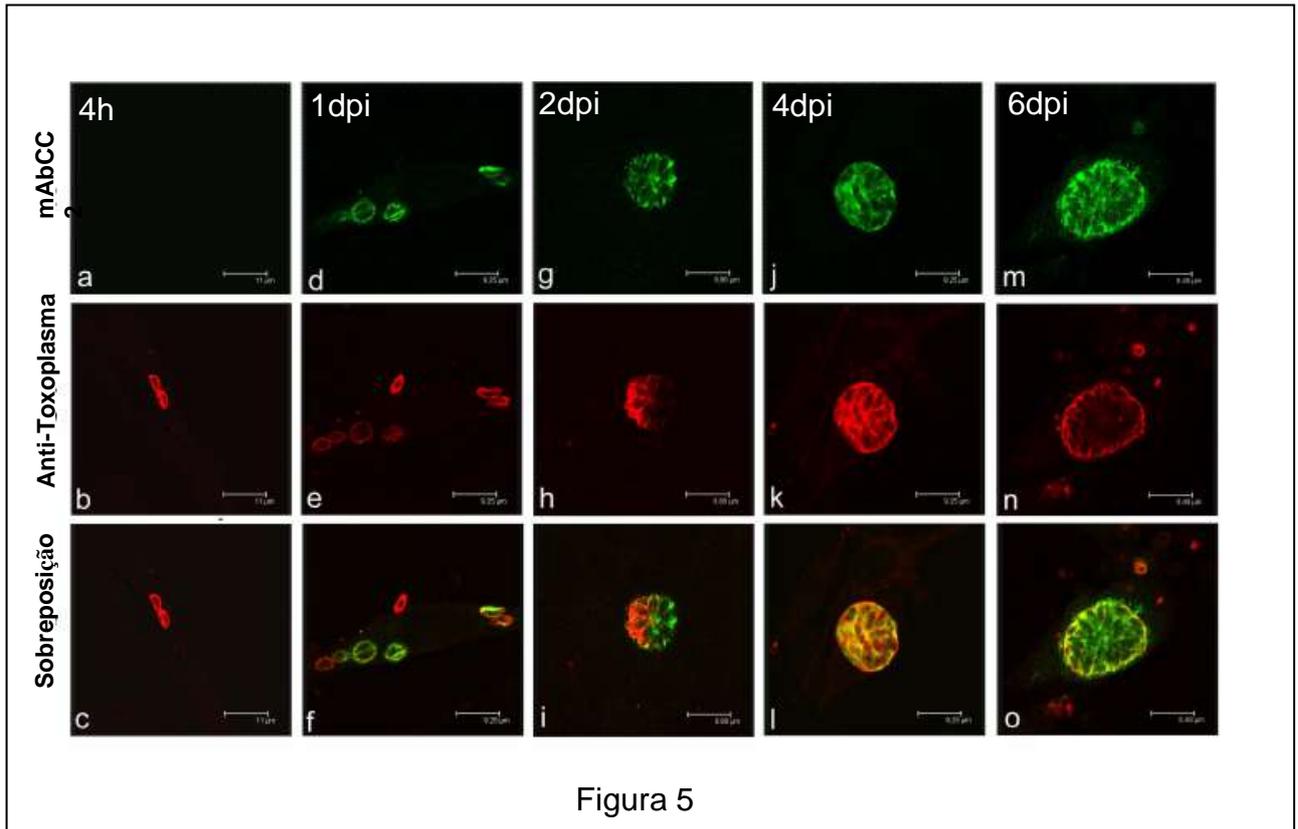
Figura 5: Estágio conversão espontânea do *T. gondii* em culturas primárias de CME na ausência de fatores externos de estresse. Imagens mostrando o desenvolvimento intracelular e a diferenciação dos parasitos, que foram monitorados desde as 4h até o 6º dia pós-infecção.

A-C: *T. gondii* se mostrou capaz de infectar as células musculares esqueléticas, a julgar pela presença de parasitos intracelulares após 4 h de infecção. Os parasitos não reagiram com o anticorpo CC2 que marcam especificamente vacúolos parasitóforos contendo bradizoítos.

D-F: Após 24 horas de infecção, múltiplos vacúolos contendo *Toxoplasma* já haviam se tornado reativos para o anticorpo CC2 (Fig. 3d), indicando início de estágio conversão para o estágio bradizoíta (Fig. 3d-f).

G-I: Vacúolo parasitóforo com reação dupla para anticorpo anti-CC2 e para *Toxoplasma* (Taquizoítos) demonstrando a presença de vacúolos mistos.

J-O: Alta reatividade ao anticorpo CC2 com a matriz do VP contendo bradizoítos dentro das células musculares esqueléticas, após 4 dias (j-l) e 6 dias (m-o).



esqueléticas (Fig. 5g-i) e a reatividade ao anticorpo CC2 com a matriz do VP contendo bradizoítos foi bastante aparente (Fig. 5g,i), envolvendo um número crescente de vacúolos positivos. A quantificação de VP de *Toxoplasma* em células musculares esqueléticas revelou um aumento proeminente do percentual de vacúolos reativos ao anticorpo anti-CC2, ao longo do período de observação de 24 h até o 6º dia. Após 24 h de interação, $23,8 \pm 3,4\%$ dos vacúolos foram CC2 positivos. A conversão dos parasitos seguiu aumentando para $31,0 \pm 2,3\%$, após 48h, $33,7 \pm 3,5\%$ após 96 h, alcançando $46,0 \pm 3,5\%$ após 144 h de infecção (Fig. 6).

2.2. Monitoramento da expressão de genes *Toxoplasma*-estágio por qRT-PCR.

Objetivando confirmar os dados obtidos de que o *Toxoplasma* prontamente se diferencia para o estágio bradizoíto em células musculares esqueléticas, a nível molecular, transcritos dos genes estágio específico ENO1 e ENO2 foram quantificados por RT-PCR em tempo real. A expressão de ambos os genes foi calculada relativa à expressão do “house-keeping gene” α -tubulina visando considerar o aumento de mRNA devido a replicação do *T. gondii* ao longo do tempo, além de considerar possíveis diferenças no isolamento de mRNA entre diferentes amostras.

A expressão relativa do gene ENO2, específico para o estágio taquizoíta, não alterou significativamente desde o primeiro dia de infecção até o sexto dia em culturas primárias de células musculares esqueléticas (Fig. 7). Em contraste, os níveis de transcritos de ENO1, específico para o estágio bradizoíta, continuaram a crescer desde as 4 horas até o final da observação com o aumento mais proeminente sendo observado aos 4º e 6º dia da infecção corrente (Fig. 7).

3. Monitoramento da diferenciação de células de linhagem de mioblasto de rato

As células de linhagem de mioblasto de rato necessitam de um estímulo transiente: meio de cultivo rico para um meio de cultivo com redução de nutrientes, desencadeando então, o processo de diferenciação celular. Uma análise geral de todos os meios e os parâmetros analisados para eleger o melhor meio de diferenciação da linhagem de mioblastos pode ser vista na Tabela 2. Foram

Figura 6: Estágio conversão espontânea do *T. gondii* em culturas primárias de CME na ausência de fatores externos de estresse.

Quantificação de vacúolos contendo bradizoítos após 4 até 144 horas de infecção. As barras representam a média dos experimentos com o desvio padrão. Após 24 h de interação $23,8 \pm 3,4\%$ dos vacúolos foram CC2 positivos. A conversão dos parasitos foi crescente $31,0 \pm 2,3\%$, após 48h, $33,7 \pm 3,5\%$ após 96 h, alcançando $46,0 \pm 3,5\%$ após 144 h de infecção

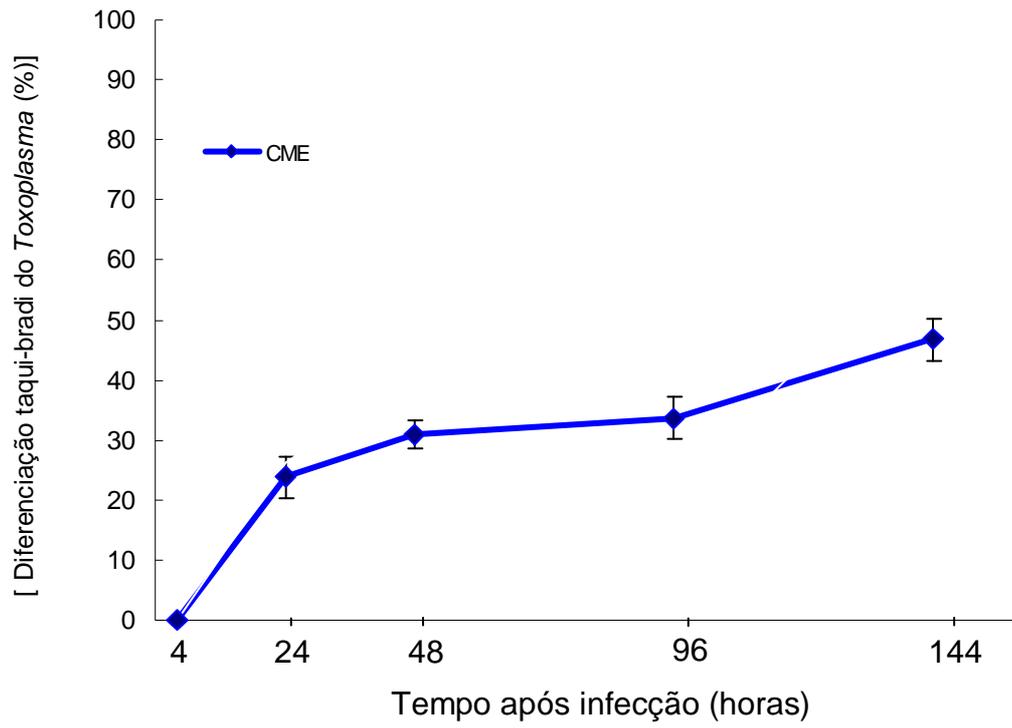


Figura 6

Figura 7: Monitoramento da expressão dos genes ENO1 e ENO2, *Toxoplasma*-estágio específico, por RT-PCR em tempo real.

A expressão relativa do gene ENO2, taquizoíto específico, não alterou significativamente desde o primeiro dia de infecção até o sexto dia em CME. Já os níveis de transcritos de ENO1, bradizoíto específico, continuaram a crescer desde as 4 horas até o final da observação. Aumento mais proeminente foi observado nos 4° e 6° dias da infecção. A expressão de ambos os genes foi calculada relativa à expressão do “house-keeping gene” α -tubulina.

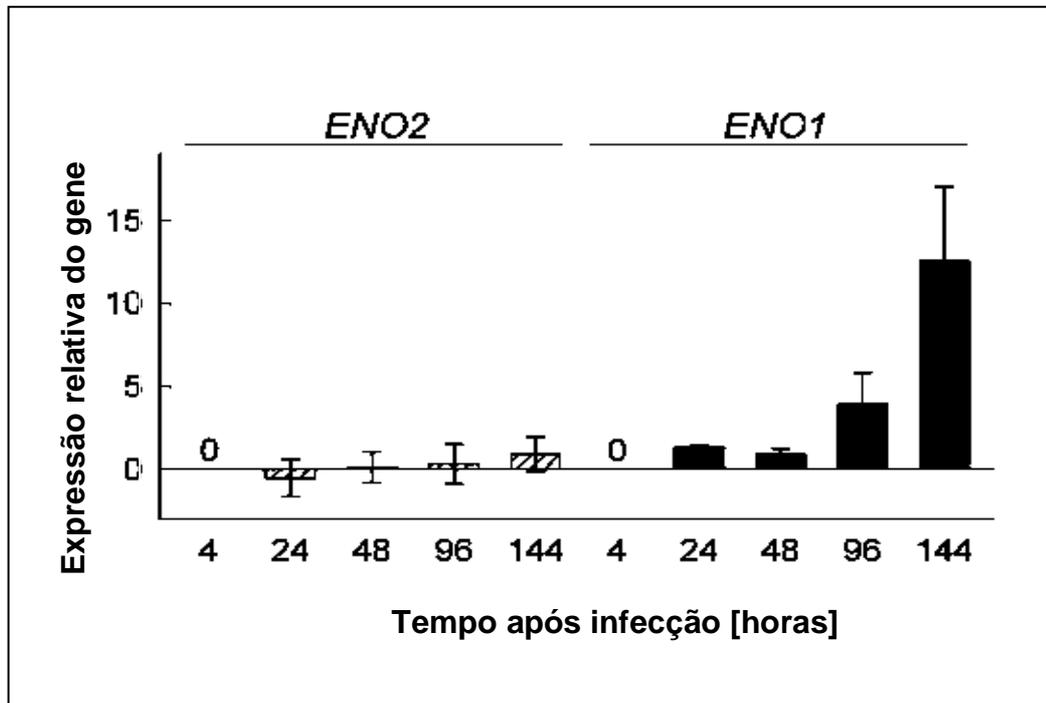


Figura 7

Tabela 2: Análise geral das culturas após 7 dias de incubação com meio DMEM suplementado ou não com soro. Análise do comportamento das culturas segundo os parâmetros: proliferação, viabilidade e diferenciação celular.

Tabela 2: Meios de diferenciação utilizados para miogênese da linhagem L6.C10

Meio de cultivo / Parâmetros analisados	0% SFB	2% SFB	2% SC	10% FCS
Proliferação	+	++	++	+++
Viabilidade celular	+	+++	+++	+++
Diferenciação celular	+++	+++	++	+

+=baixo; ++ = satisfatório; +++=ideal

consideradas a proliferação, viabilidade e diferenciação celular. Após 2 dias de cultura, os mioblastos mantidos somente em meio Dulbecco apresentaram alta perda celular. Por outro lado, a formação de miotubos jovens mostrou-se imediata nestas condições após 2 (Fig. 8a) e 4 dias (Fig. 8b) de indução da diferenciação. Após 7 dias, foi possível observar o longo de toda superfície plaqueada, miotubos ainda jovens, em alinhamento celular e muitos mioblastos ainda sem entrar no programa miogênico (Fig. 8c).

Os mioblastos mantidos em meio suplementado com 2% SFB apresentou, após 2 dias de cultivo nestas condições, uma proliferação celular notavelmente melhor que as mantidas em meio simples (Fig. 9a). Este fato proporcionou uma maior proximidade das células e formação de miotubos jovens (cerca de 2-3 núcleos por sincício) (Fig. 9b) e miotubos maduros, robustos de ramificados, após 7 dias de cultivo (Fig. 9c).

A suplementação do meio Dulbecco com 2% soro de cavalo apresentou também uma diminuição da multiplicação celular (Fig. 10a) e formação de poucos miotubos após 4 dias indução da diferenciação (Fig. 10b). No 7º dia, as culturas não apresentaram mudanças significativas, mantendo o número reduzido de miotubos (Fig. 10c).

Os mioblastos mantidos em Dulbecco suplementado com 10% SFB, meio padrão aplicado para manutenção de rotina dos mioblastos, proporcionou uma intensa atividade proliferativa das culturas ao longo de toda cinética ao longo dos 7 dias de observação (Fig. 11a). Raros miotubos foram visualizados revelando uma baixa miogênese (Fig. 11b). A intensa multiplicação celular levou a formação de culturas densas, com alto percentual de mioblastos/miócitos, inapropriadas para a proposta de nossos ensaios (Fig. 11c).

4. Monitoramento da conversão de taquizoíto-bradizoíto de *T. gondii* em linhagens celulares de músculo (L6C10) e de fibroblasto (L929)

Alta taxa de conversão para o estágio bradizoíto do *T. gondii* foi observada após infecção da linhagem de mioblasto de rato L6.C10 (Fig. 12a-o), que apresentou cerca $26,1 \pm 3,5\%$ de diferenciação taquizoíto-bradizoíto, após as primeiras 24 h de infecção (Fig. 14). Em contraste, células da linhagem de fibroblasto de camundongo L929 infectadas pelo *T. gondii*, proporcionaram neste mesmo período de infecção somente $3,2 \pm 0,8\%$ de estágio conversão de taquizoítas de *Toxoplasma* (Fig. 13e-f), não ultrapassando o percentual de 20% após 144 h de infecção (Fig. 14).

Figura 8: Análise da miogênese de células de linhagem de mioblasto de rato (L6.C10) mantidas em meio Dulbecco por microscopia de contraste de fase.

A: Culturas mostrando, após 2 dias de cultura, formação de miotubos jovens (seta), apesar da alta perda celular, e/ou inibição da proliferação, e/ou baixa adesão celular.

B: Imagens mostrando formação de miotubos jovens (seta) (4 dias).

C: Imagem mostrando alinhamento celular e com predominância de fusão entre miotubos (*) (7 dias).

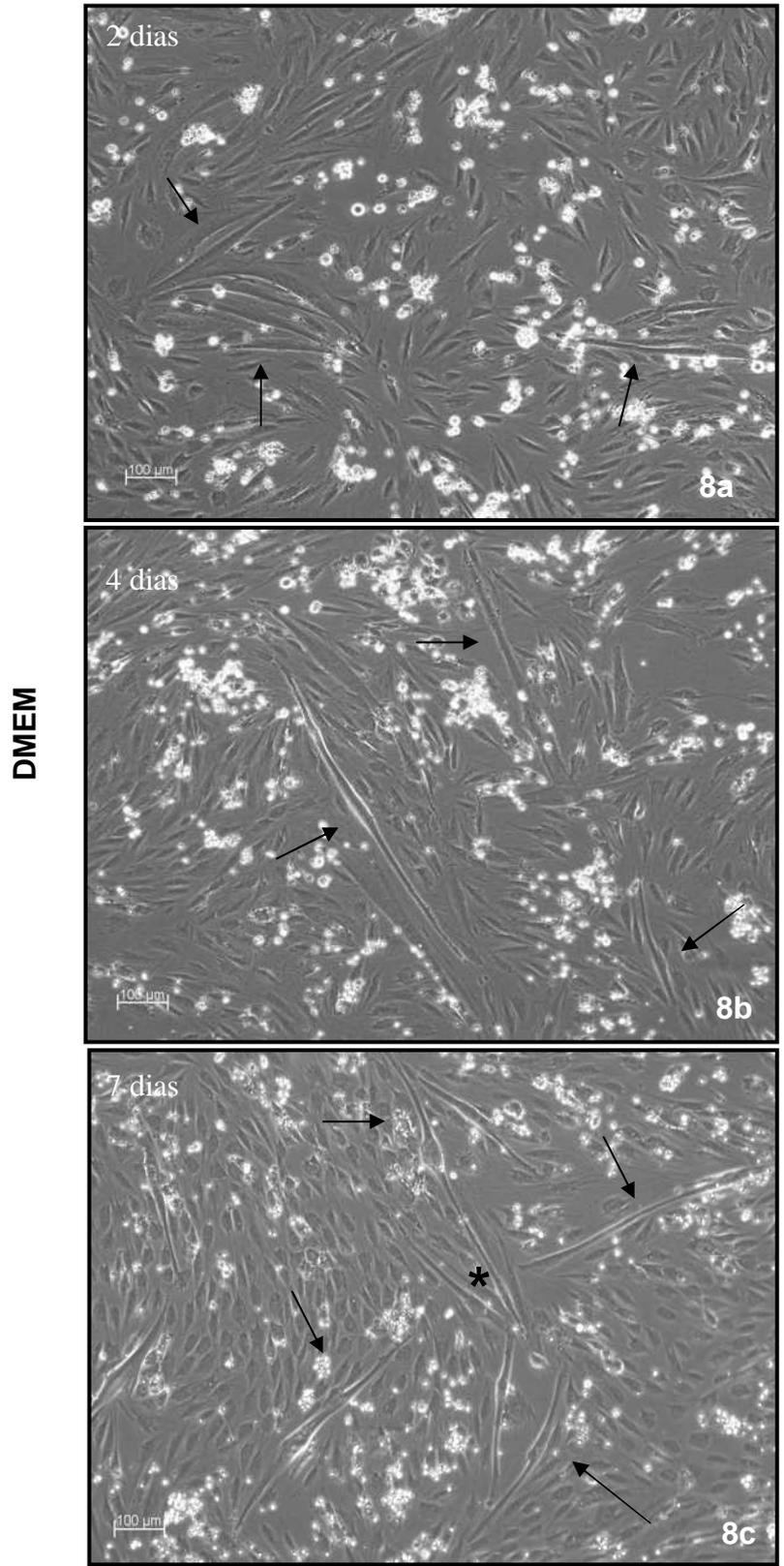


Figura 8

Figura 9: Análise da miogênese de células de linhagem de mioblasto (L6.C10) por microscopia de contraste de fase mantidas em DMEM suplementado com 2% SFB.

A: Proliferação celular notavelmente melhor que as mantidas em meio simples, após 2 dias de cultivo,

B: Formação de miotubos jovens (cerca de 2-3 núcleos por sincício) (seta) (4dias).

C: Miotubos maduros, robustos e ramificados, após 7 dias de cultivo (seta) indicando indução da diferenciação de células de linhagem de mioblasto.

DMEM + 2% soro fetal bovino

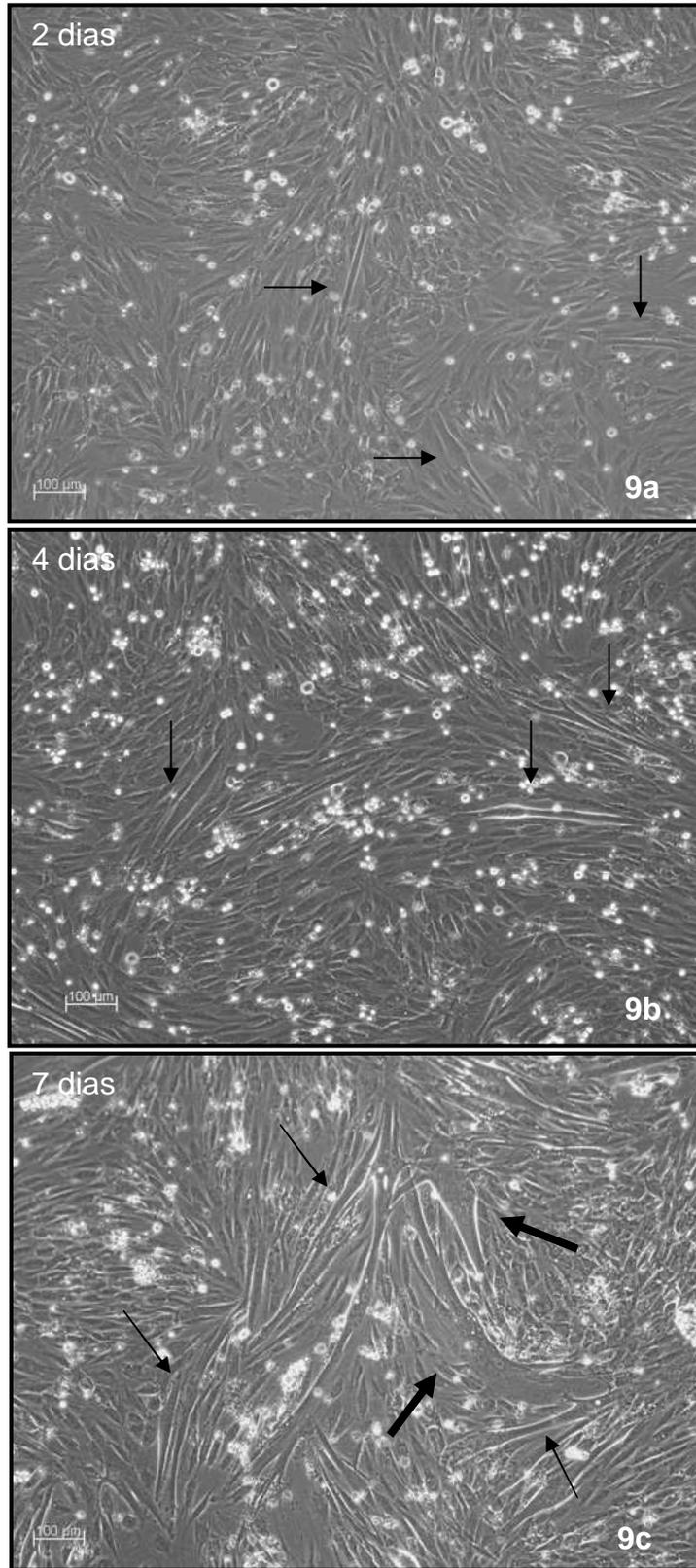


Figura 9

Figura 10: Análise da miogênese de células de linhagem de mioblasto (L6.C10) por microscopia de contraste de fase em meio DMEM suplementado com 2% soro de cavalo.

A: Imagem mostrando multiplicação celular reduzida.

B: Miotubos jovens formados na cultura.

C: Após 7 dias de cultivo, as culturas apresentaram baixa fusão entre miotubos.

DMEM + 2% soro de cavalo

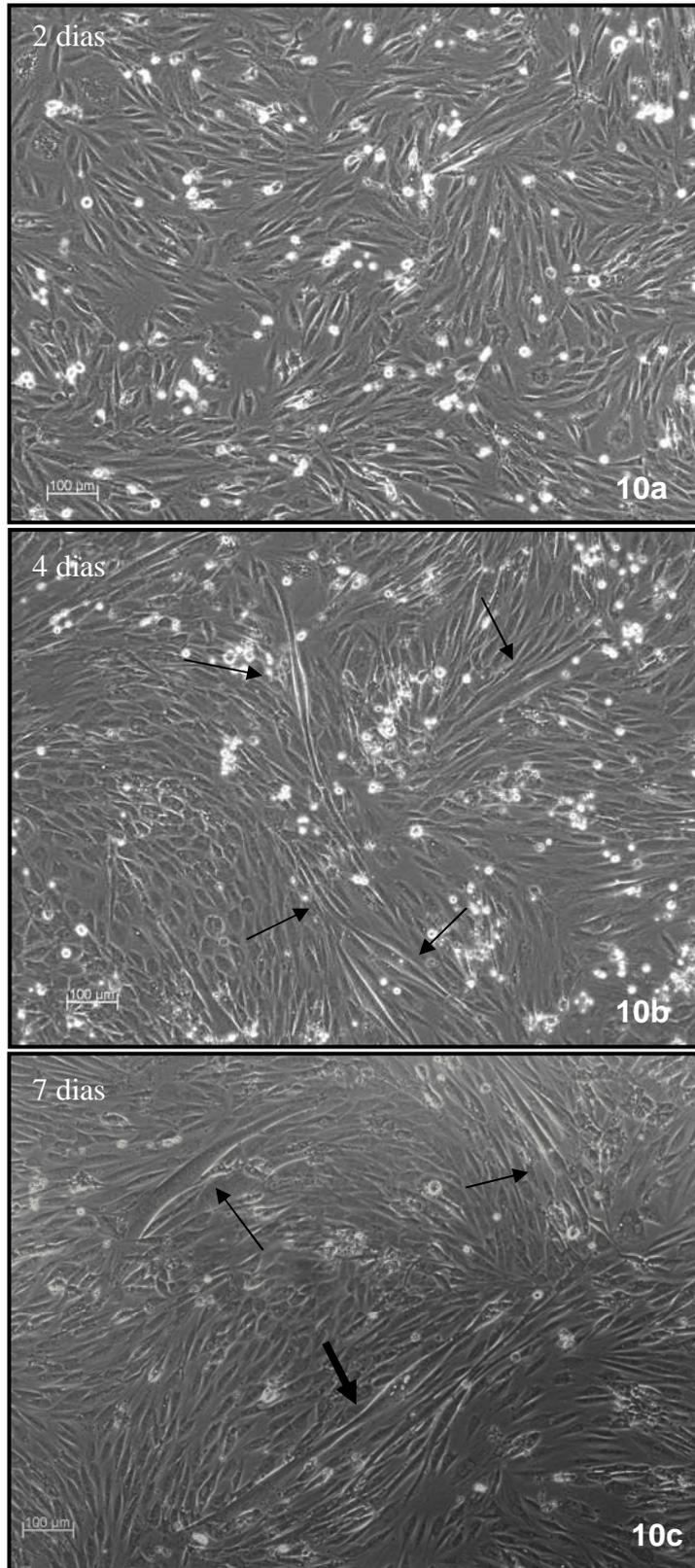


Figura 10

Figura 11: Análise da miogênese de células de linhagem de mioblasto (L6.C10) por microscopia de contraste de fase em DMEM suplementado com 10% SFB.

A: Intensa atividade proliferativa dos mioblastos

B: Imagem mostrando raros miotubos formados após 4 dias de cultivo em meio de diferenciação.

C: Intensa multiplicação celular com manutenção de alto número de miócitos e baixa fusão celular.

DMEM + 10% Soro fetal bovino

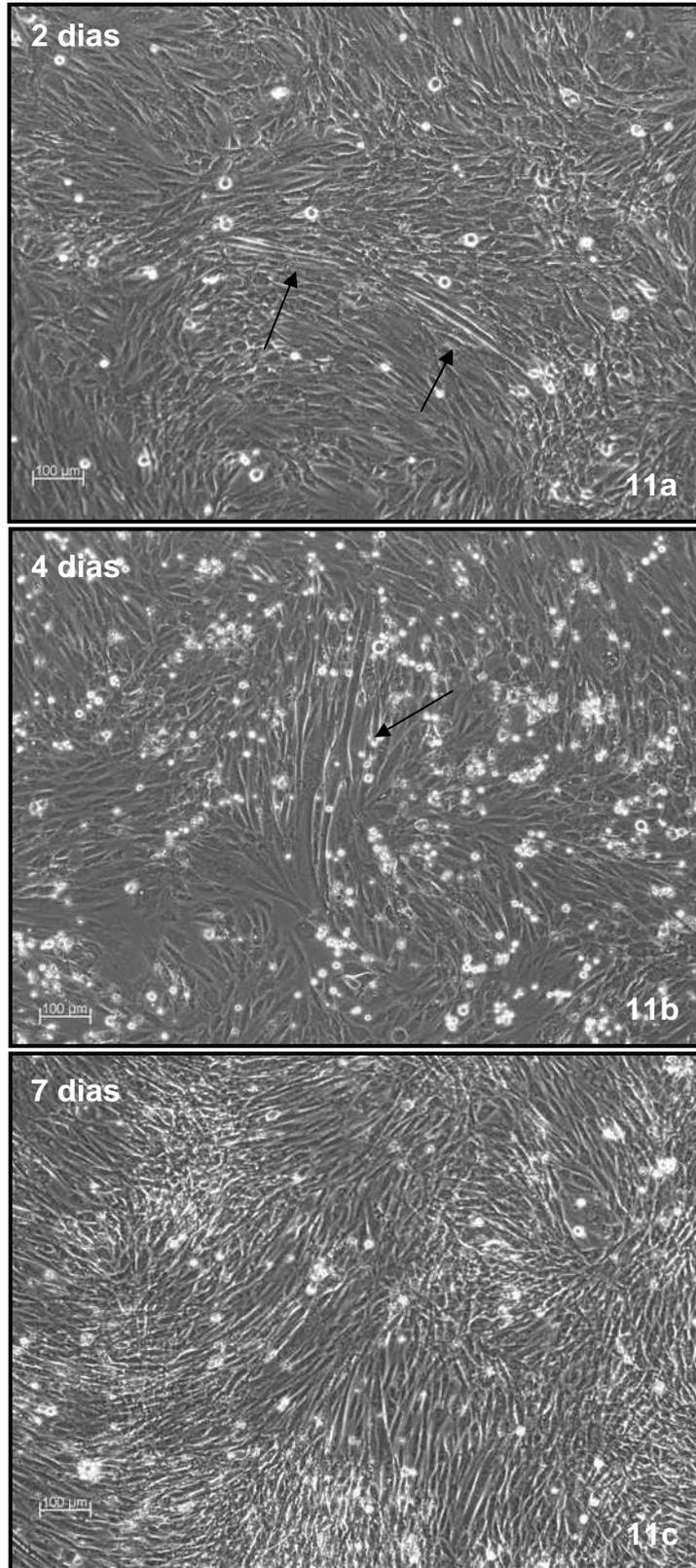


Figura 11

Figura 12: Estágio conversão espontânea do *T. gondii* em culturas diferenciadas de linhagens celulares de mioblasto (L6C10). O monitoramento da conversão de taquizoíto-bradizoíto de *T. gondii* desde 4h até 144 horas de infecção.

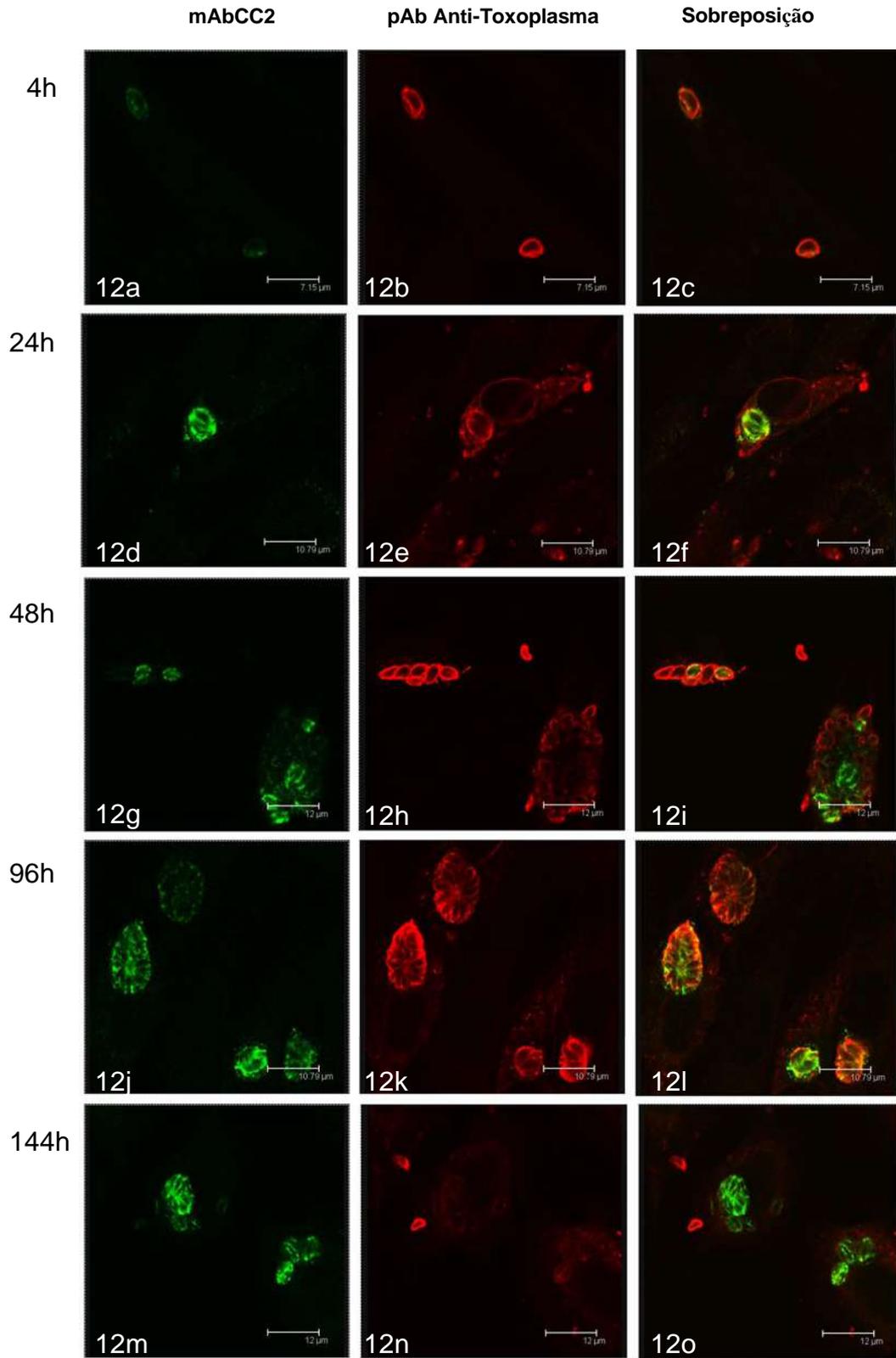


Figura 12

Figura 13: Monitoramento por microscopia confocal a laser da conversão de taquizoíto-bradizoíto de *T. gondii* em linhagens de fibroblasto (L929). O monitoramento da conversão de taquizoíto-bradizoíto de *T. gondii* desde 4h até 144 horas de infecção.

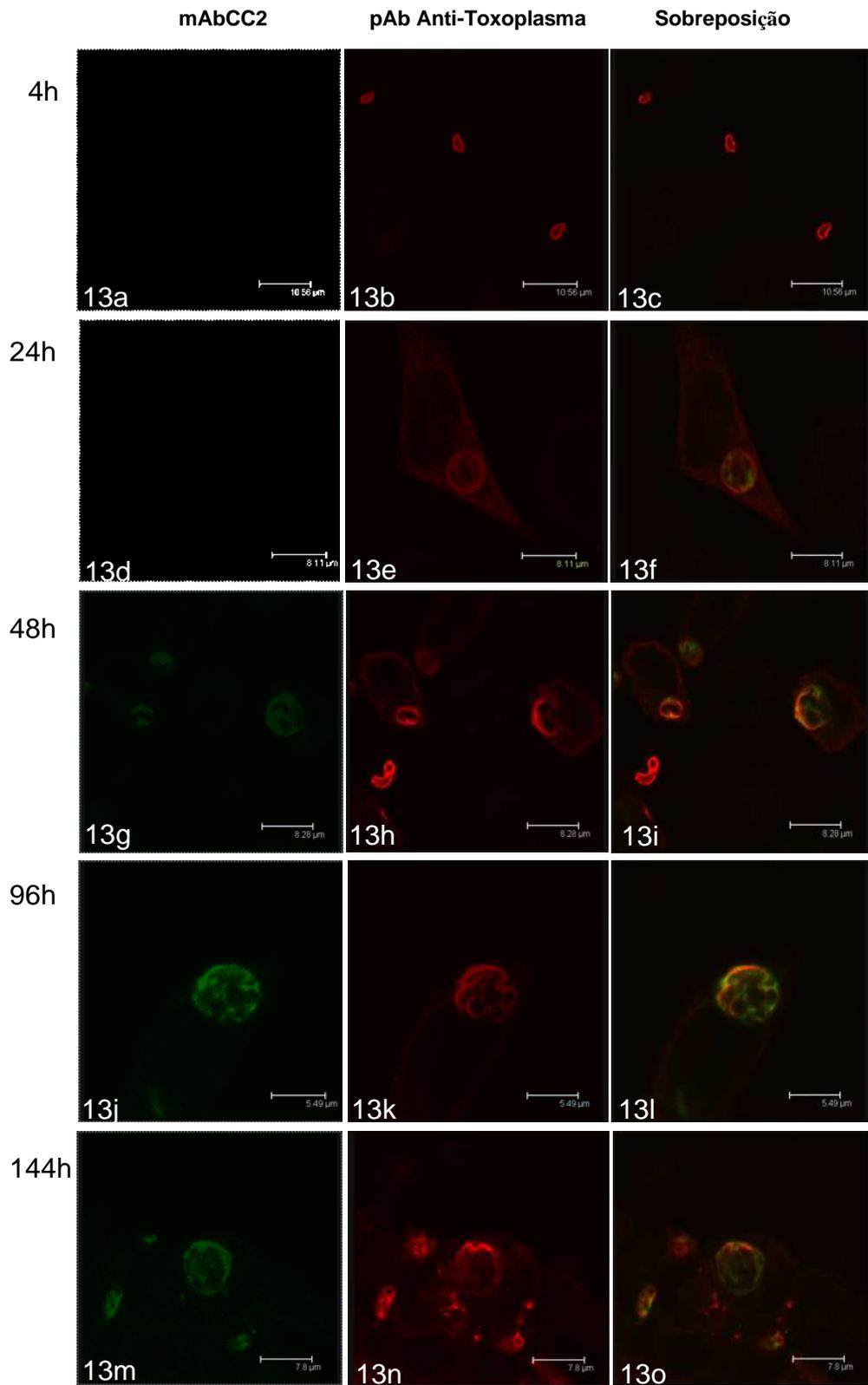


Figura 13

Figura 14: Gráfico mostrando comparativamente as taxas de conversão do *Toxoplasma* em culturas primárias de CME (azul), em células diferenciadas de linhagem de mioblasto (rosa), em linhagem de fibroblasto (vermelho). Gráfico mostra altas taxas de estágio conversão em CME. Observa-se que CME infectadas pelo *T. gondii* e em presença de IFN gama e LPS (verde) não foram capazes de induzir a conversão dos taquizoítos para bradizoítos. As barras representam a média dos experimentos com o desvio padrão.

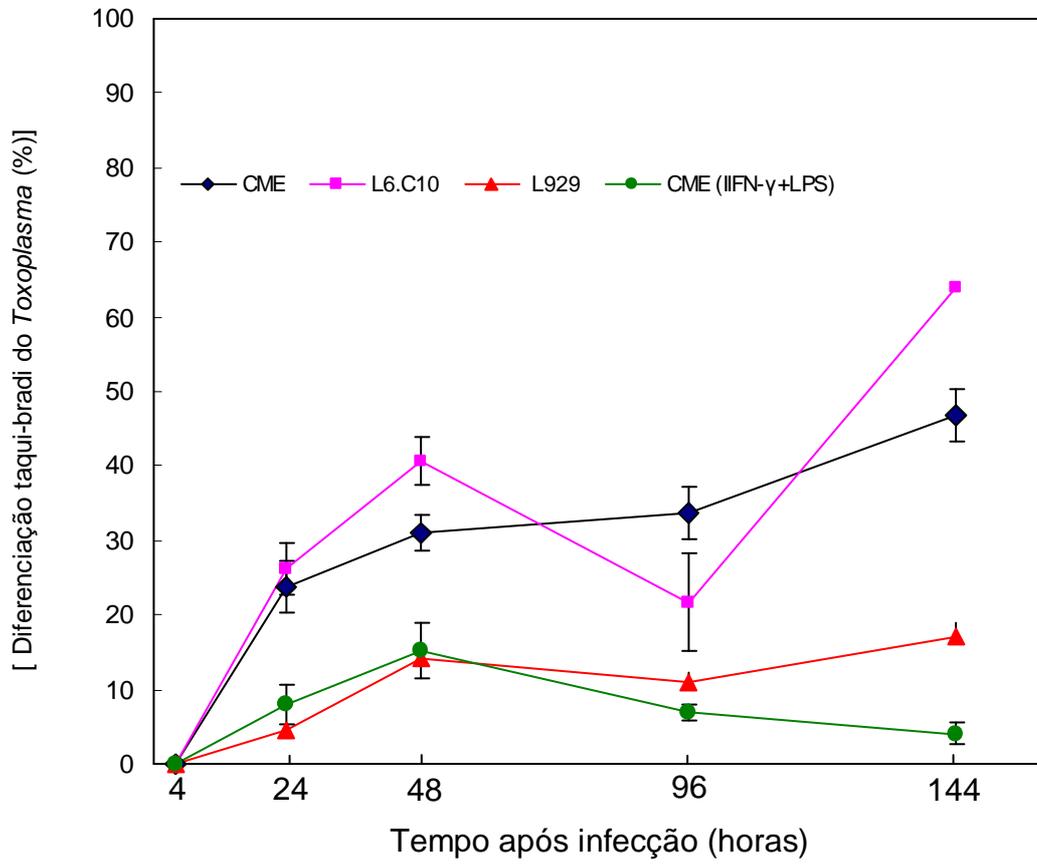


Figura 14

5. Indução da estágio conversão

5.1 Aumento do pH e ausência de CO₂ em cultura primária de CME

O ensaio do estágio conversão do *Toxoplasma* através da indução com meio alcalino (pH 8.1) prejudicou fortemente a viabilidade celular. Com o objetivo de contornar a morte celular, o meio foi adicificado para pHs mais baixos - 7.8 e 7.6 -, sem sucesso.

5.2 Indução do estágio conversão com IFN-gama em presença de LPS

A estágio conversão do *T. gondii*, mediada por IFN-gama na presença de LPS, apresentou baixas taxas de diferenciação do parasito: 0 %, 8,0±2,1 %; 11, 2±1,0%, 7,0±1,0% e 4,1±1,4%, após 4 h, 1, 2, 4 e 6 dpi, respectivamente (Fig. 15).

Figura 15: Monitoramento por microscopia confocal a laser da conversão de taquizoíta-bradizoíta de *T. gondii*. em cultura primária de CME em presença de IFN gama e LPS. Apesar da baixa taxa de estágio conversão, alguns poucos parasitos foram reativos ao anticorpo que reage com bradizoítos, visualizados em verde.

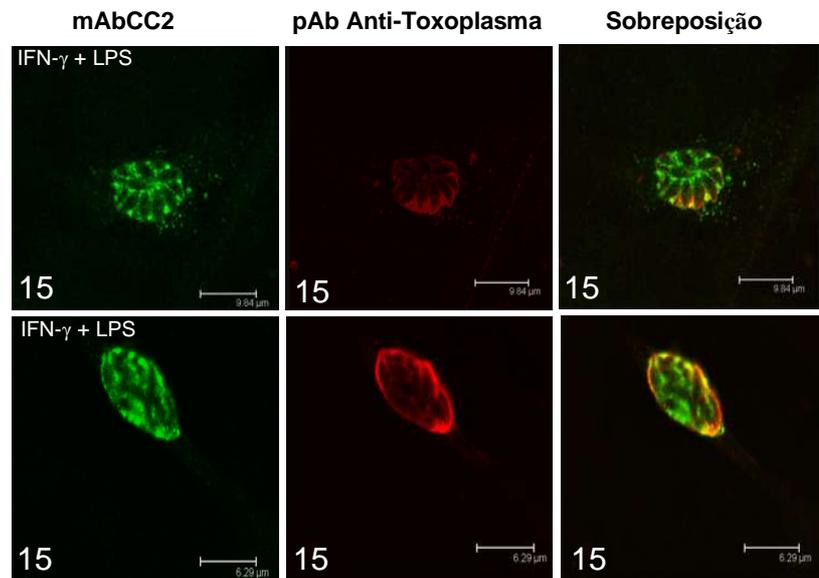


Figura 15

DISCUSSÃO

V DISCUSSÃO

A presente tese abordou aspectos biológicos de culturas primárias de células musculares esqueléticas *in vitro* através da revelação da expressão gênica de fatores reguladores da miogênese. Em uma outra vertente, foi analisada a conversão de taquizoítos-bradizoítos de *T. gondii* da cepa NTE na ausência de fatores de estresse exógenos em diferentes tipos celulares: (i) culturas primárias de músculo esquelético (CME), (ii) linhagem de mioblasto de rato (L6.C10) e, (iii) linhagem de fibroblasto (L929). Adicionalmente, estudos preliminares de estágio-conversão induzida por interferon na presença de lipopolissacarídeo em CME também foram realizados.

Nossos resultados sugerem fortemente que a interconversão de taquizoítos em bradizoítos seja modulada pela célula hospedeira, diante da evidenciação de conversão espontânea em células musculares esqueléticas quando comparada com os outros tipos celulares testados.

Estágio-conversão, formação cística e resposta celular têm sido estudados em tecidos do cérebro de camundongos e de ratos infectados *in vivo* (Gazzineli e cols., 1992; Sclüter e cols., 2001; 2003). No entanto, nenhuma ou pouca atenção tem sido dada, até o momento para o estudo deste fenômeno em células musculares esqueléticas, embora esta seja uma das células alvo na fase crônica da toxoplasmose (Andrade e cols., 1998, 1999, 2001; Monteiro-Leal e cols., 1998; Barbosa e cols., 1999, 2005; Guimarães e cols., 2008). Outro aspecto de igual relevância é o papel da interconversão como uma das mais importantes vias de transmissão do parasito em humanos, através da ingestão de carne crua ou mal passada contendo cistos do parasito (Frenkel, 1973; revisto em Weiss e Kim, 2000 e em Tenter e cols., 2000).

O conjunto de resultados obtidos na presente tese gerou um manuscrito submetido à publicação. Com base nos ensaios desenvolvidos para a geração desse artigo, foram acumuladas experiências que possibilitaram a redação de um artigo de revisão com discussão em profundidade das principais condições de estresse celular utilizadas para indução da conversão do *Toxoplasma* entre os estágios taquizoíta e bradizoíta em culturas *in vitro*. Esta revisão traz em destaque as células musculares esqueléticas como um modelo eficiente para o estudo do fenômeno da diferenciação espontânea do parasito.

Estudos anteriores *in vivo* indicam a predileção pelo *T. gondii* em formar cistos nas musculaturas cardíaca e esquelética e no sistema nervoso central (Jacobs, 1967; Mehlhorn e Frenkel, 1980; Dubey, 1988; Frenkel, 1990; Dubey e cols., 1998). Recentemente, foi postulada a hipótese que relaciona o papel protetor da neuroglobulina e mioglobulina frente ao efeito toxoplásmico do óxido nítrico (Ascenzi e cols., 2005), também observado durante a infecção com *Trypanosoma cruzi* em cardiomiócitos e *Plasmodium falciparum* em eritrócitos (Taylor-Robinson, 1998; Ascenzi e cols., 2001). Neste contexto, o efeito protetor dessas proteínas poderia justificar a permanência por longo tempo do *T. gondii* como cisto tecidual, na retina e nos músculos cardíaco e esquelético. Na presente tese, nós utilizamos como modelo de estudo da conversão taquizoíta-bradizoíta, células musculares esqueléticas obtidas de cultura primária e linhagens de mioblastos e de fibroblastos, sem a introdução de estresse exógeno, objetivando-se analisar se o tipo celular era determinante neste processo. Previamente nós descrevemos a cistogênese do *T. gondii* em CME *in vitro* através da infecção com bradizoítos (Guimarães e cols., 2008). Nossos estudos mostraram pela primeira vez, independente de estímulos exógenos, altas taxas de diferenciação de taquizoítos-bradizoítos de *T. gondii* em células musculares (CME w linhagem L6.C10). Em contrapartida, os ensaios com linhagem L929 mostraram, após 48 horas de infecção com taquizoítos, um baixo percentual de vacúolos contendo bradizoítos.

A alta relevância de CME para investigar a diferenciação de taquizoítos em bradizoítos de *Toxoplasma* exigiu o estabelecimento de culturas de longo termo. Esta metodologia foi adaptada da literatura e muito bem estabelecida pelo nosso grupo (Barbosa e cols., 2000). O estabelecimento de culturas de longo termo, só foi possível em função do revestimento prévio das lamínulas de vidro e das garrafas plásticas com poli-ornitina e laminina, o que representou uma etapa crucial para manutenção das culturas, assegurando: (i) adesão ao substrato por longos períodos; (ii) contração espontânea dos miotubos; e, (iii) permanência da monocamada infectada por períodos de até dez dias. A laminina é uma proteína de matriz extracelular muito utilizada para cultivo de células musculares, auxiliando inclusive no alinhamento das células e sua diferenciação (Mechan, 1991). A caracterização da miogênese mostrou a diferenciação das culturas, através do elevado número de miotubos formados *in vitro* e da expressão de fatores reguladores da miogênese como Myf5 e MyoD, ratificando o que tem sido descrito em outros sistemas (revisto em Yablonka-Reuveni e cols., 2008 e em Sterwart e Rittweger, 2006). Além disso, as

culturas se caracterizavam fenotipicamente por conter miotubos altamente diferenciados, de diversos tamanhos e calibres, que muitas vezes atravessam toda extensão da superfície plaqueada. Estes miotubos, que apresentavam cerca de 10 a 20 núcleos, se contraíam espontaneamente, como documentado por vídeo microscopia.

Modelos celulares *in vitro* empregados para o estudo da diferenciação de taquizoíta para bradizoíta de *T. gondii* têm sido estabelecidos, empregando geralmente linhagens celulares e condições de estresse que objetivam mimetizar a resposta imune do hospedeiro (Bohne, 1996). O desenvolvimento de bradizoítos *in vitro*, até o momento, tem sido apontado como um estímulo mediado por estresse que leva à adaptações metabólicas e morfológicas do parasito. Estas condições incluem tratamento com interferon gama (Bohne e cols., 1993), inibidores de mitocôndria (Bohne e cols., 1994), pH alcalino (Soête e cols., 1993), altas temperaturas (Soête e cols., 1994), estresse de nutrientes (Fox e cols., 2004) e drogas que limitam a multiplicação do parasito (Bohne e cols., 1993; Gross & Pohl, 1996). Condições de estresse como pH alto, por exemplo, facilitam consideravelmente a análise do processo de cistogênese. Este sistema artificial, porém, pode não necessariamente refletir os requerimentos da estágio-conversão durante o curso natural da infecção, tornando-se assim uma estratégia bastante questionável quando se investiga a conversão do parasito. O desenvolvimento de bradizoítos deve compartilhar aspectos comuns a processos de diferenciação de outros microorganismos, induzidos por estresse, como por exemplo, privação de nutrientes (Weiss e Kim, 2000). Sendo um parasito obrigatoriamente intracelular, é bem provável que a diferenciação do *T. gondii* dependa parcial ou predominantemente de fatores reguladores diferentes dos observados em organismos comensais ou de vida livre. Assim, descobertas recentes, apóiam a idéia de que a formação de bradizoítos deve ser fisiologicamente regulada por outros fatores que não o estresse (Payne e cols., 2003; Sinai e cols., 2004; Molestina e Sinai, 2005; Radke e cols., Radke e cols., 2006). Uma outra variável que deve ser considerada é o tipo de cepa do parasito, uma vez que cepas avirulentas do tipo II e III geralmente se diferenciam em altas taxas do que as virulentas do tipo I (Bohne e cols., 1994; McHugh e cols., 1994; Radke e cols., 2005). Além disso, o estágio infectivo do *Toxoplasma* também deve ser crítico para a conversão do parasito, uma vez que uma alta freqüência de desenvolvimento de bradizoítos a partir de taquizoítos foi observada após inoculação de esporozoítos (Jerome e cols,

1998; Radke e cols., 2003). Assim, o desenho experimental empregado na presente tese incluiu cepa do *T. gondii* tipo II avirulenta com alta capacidade de indução da conversão e formação de cistos e formas taquizoítos como estágio infectivo.

Uma das questões também propostas na presente tese foi esclarecer se, a variável “tipo celular” se somaria à variável “estresse aplicado”, provocando um diferencial na taxa de estágio-conversão e ainda, se o parasito responde diretamente ao estresse ou às mudanças na célula hospedeira provocadas por este estímulo. Na verdade, parece existir um consenso de que seria uma combinação dos dois eventos, considerando-se que parasitos submetidos às condições de estresse, na ausência de célula hospedeira, também apresentam altas taxas de diferenciação quando comparados aos parasitos submetidos em condições normais de cultura (pH 7.2) (Yahiaoui e cols., 1999). Na nossa experiência e nas condições experimentais empregadas, a tentativa de manipulação do meio de cultura pela aplicação de diferentes valores de pH (7,6-8.2), visando induzir o estágio-conversão de *T. gondii* em células musculares, não obteve sucesso, diferentemente do que tem sido descrito em outros tipos celulares (Soète e cols., 1993, 1994). As células, principalmente CMEs, não suportavam tal agressão, sofrendo alteração morfológica, incompatível com o fenótipo das células controle, com destacamento da superfície plaqueada, inviabilizando a realização de experimentos variando o pH do meio.

A estágio-conversão de *T. gondii* foi acompanhada por períodos de 4 h até 6 dias pós-infecção. Uma das ferramentas utilizadas para acompanhamento da conversão taquizoíta-bradizoíta, foi a imunocitoquímica empregando anticorpos estágio específicos. Em estudos anteriores foi demonstrado por imunofluorescência e citoquímica ultra-estrutural, que o anticorpo CC2 marca a parede de cistos teciduais de camundongos em fase crônica da infecção, isto é, estruturas características de cistos teciduais maduros de *Toxoplasma* (Gross e cols., 1995; Ferguson, 2004). Apesar de ainda faltar um marcador antigênico definitivo para este tipo de cisto (Tomavo e Weiss, 2007), a predominância de marcação CC2 positiva (Fig. 3m-o) indica que se trata de vacúolos parasitóforos contendo bradizoítos maduros. Recentemente, demonstramos por abordagens ultra-estruturais que a cistogênese do *T. gondii* em CME se completa 96 h após infecção por bradizoítos, resultando na formação de parede cística (Guimarães e cols., 2008). Se o tipo célula hospedeira é um fator determinante para a conversão taquizoíta-bradizoíta do parasito é ainda uma questão controversa. As CME obviamente proporcionam um

ambiente propício que sustenta o desenvolvimento de bradizoítos e, pelo menos até um certo ponto, a maturação dos cistos teciduais, sem a necessidade de estresse exógeno. Desta forma, nós propomos que em contexto molecular e celular adequados, altos níveis de diferenciação para bradizoítos de *T. gondii* ocorra espontaneamente, particularmente em células musculares esqueléticas.

Taquizoítos de *Toxoplasma* se mostraram capazes de infectar as células musculares como previamente descrito (Andrade e cols., 2001; Barbosa e cols., 2005). *T. gondii* apresenta uma ativa invasão em virtualmente todos os tipos de células de mamíferos (Dobrowolski e Sibley, 1996) invasão esta, direcionada pelo glideosomo do parasito (Keely e Soldati, 2004). Após 24 h de infecção, CMEs apresentavam parasitos no interior de vacúolos e marcados pelo anticorpo CC2. Vacúolos parcialmente marcados por CC2 indicaram que naquelas culturas, não houve sincronização do estágio-conversão, em concordância com a descrição em outros modelos celulares (Tomavo e cols., 1991; Bohne e cols., 1993b; Soête e cols., 1993; 1994; Weiss e cols., 1995). Além disso, em diferentes tipos celulares infectados com formas taquizoítas e/ou bradizoítas de *T. gondii* têm sido identificados dentro de um mesmo vacúolo parasitos expressando antígenos específicos para as duas formas infectivas. Assim, considerando-se que todos os parasitos dentro de um vacúolo parasitóforo sejam derivados de um único parasito, isso indica que o disparo da conversão taquizoíto↔bradizoíto não seja sincronizado, como já proposto por outros autores (Dardé e cols., 1989; Bohne e cols., 1993b; Soête e cols., 1993). Então, parasitos provenientes de uma população homogênea (cistos obtidos de cérebro ou taquizoítos obtidos da cavidade peritoneal) nas mesmas condições de cultura podem se desenvolver por diferentes vias, resultando em uma heterogeneidade de estágios na mesma célula e até mesmo em um único vacúolo parasitóforo. O percentual de vacúolos reativos para CC2 foi mantido nos 2° e 4° dias pós-infecção, aumentando ao longo da cinética e culminando no 6° dia com aproximadamente 50% de reatividade. A mesma cinética foi realizada com células de linhagem de mioblasto e mostraram também contribuir com um percentual de mais de 40% de estágio-conversão no 2° dia de infecção. Ao longo do período de observação a partir do 3° dia ocorreu uma queda no número de bradizoítos intracelulares e progressivamente um aumento de taquizoítos, decorrente da reativação do processo de estágio-conversão, levando à re-diferenciação em taquizoítos. Como era previsto, os taquizoítos rapidamente se multiplicaram, estabelecendo o ciclo lítico do *T. gondii* e levando à lise das células hospedeiras.

Nessas condições, ocorreu a liberação tanto das formas taquizoítas quanto de bradizoítas. Eventualmente, foi possível verificar em algumas culturas que a diferenciação se manteve, chegando a atingir cerca de 64% de vacúolos contendo bradizoítos no 6º dia. Os resultados obtidos com linhagem de fibroblasto foram acentuadamente diferentes, mostrando um percentual bem baixo após o primeiro dia de infecção, se mantendo assim ao longo do experimento, não atingindo 20% de reatividade no 6º dia. Os resultados descritos até o momento sugerem que durante a conversão *in vitro* taquizoíta ↔ bradizoíta de *T. gondii*, fatores intrínsecos físicos e/ou bioquímicos determinados pelo modelo celular, possam estabelecer o destino intracelular do parasito. Dessa forma, reproduziria o que ocorre no sistema *in vivo*, com o estabelecimento de cistos que levarão à fase crônica da doença, de fundamental importância para a sua manutenção no hospedeiro. A evidência de que a conversão para bradizoítos foi consideravelmente maior em CME do que em fibroblastos, reforça a idéia de que a célula hospedeira impacta drasticamente a diferenciação do *T. gondii* para o estágio de vida latente.

Recentemente, Radke e cols. (2006) demonstraram um papel funcional do autoantígeno-1 humano de divisão celular (CDA-1) em bradizoítos em desenvolvimento em fibroblastos humanos. Enquanto isso, em CME, bradizoítos se desenvolveram espontaneamente, indicando que estas células proporcionam um nicho que promove o estágio-conversão do parasito. Isso nos permite especular que esta conversão pode ser dependente da expressão constitutiva de CDA-1. Esta é uma questão ainda em aberto, como sugerido por Radke e cols. (2006). Já que os miotubos aqui empregados são produtos da progressão do ciclo celular (Sabourin and Rudnicki, 2000), reguladores negativos do ciclo da célula hospedeira, como por exemplo, o CDA -1, são possíveis candidatos que poderiam promover um sinal para o comprometimento do desenvolvimento de bradizoítos de *T. gondii* em CMEs. Se, ou em que extensão o ambiente específico do músculo estriado (Wiendl e cols., 2005) regula a persistência *in vivo* por longo tempo de cistos de *T. gondii*, é um ponto que necessita ser elucidado.

Direcionar o processo da estágio-conversão ao estresse nutricional ocasionado pela morte das células por apoptose ou qualquer outro mecanismo, não se aplica uma vez que: (i) o meio para cultura primária de músculo é muito mais rico em nutrientes quando comparado ao meio empregado para linhagens celulares; (ii) os eventos de estágio-conversão foram monitorados no mínimo em triplicata; (iii) as culturas eram checadas diariamente e o meio trocado a cada dois dias; (iv) apoptose

em células infectadas pelo *T. gondii* é inibida (revisto em Lüder e Gross., 2005), gerando assim a lei da vantagem para a sobrevivência do parasito, garantindo sua multiplicação e permanência por longo tempo no hospedeiro; (v) a cistogênese *in vitro* pode ser acompanhada por até 31 dias em CME com excelente preservação celular (Guimarães e cols., 2008)

Com base nos estudos iniciais de Bohne e cols (1993, 1994) e de Soête (1994) que utilizaram como a adição de drogas como estímulo para a diferenciação, existe o dogma de que este processo ocorre apenas em resposta a fatores exógenos. Em nossos estudos de estágio-conversão não foi utilizada qualquer manobra experimental de ordem física ou química e altos índices de diferenciação foram observados, o que favorece a hipótese de que a conversão espontânea, nas nossas condições de manutenção das culturas, advém de outros fatores que não a resposta a estresse exógeno. Alguns autores têm sugerido, a partir de ensaios com diferentes linhagens celulares, que o tipo celular não contribui de forma importante para a formação de bradizoítos (Dubey e cols, 1999; Lindsay e cols, 1991; McHugh e cols, 1994). No entanto, é importante ressaltar que esta questão nunca foi comparada quantitativamente associado ainda, à falta de modelos celulares “naturais” onde de fato ocorre o processo de diferenciação do parasito desencadeando a cistogênese, por exemplo, o modelo de células musculares esqueléticas. O único artigo que levanta a questão da influência da célula hospedeira nesse processo foi de Jones e cols. (1986), utilizando cultura primária de astrócitos, sem contudo ser conclusivo, por falta de estratégias que pudessem apoiar essa hipótese. Assim, se há fatores intrínsecos da célula que possam direcionar o destino intracelular do parasito, esse é um processo inerente ao sistema biológico natural que não podemos controlar, nem mesmo no sistema *in vivo*. A obtenção da conversão espontânea de *T. gondii* em CME como descrita na presente tese, fortemente possibilita inferir que o tipo celular possa ser um dos fatores indutores desse processo, como deverá ser discutido melhor mais a frente.

Os nossos dados mostraram que na presença de IFN-gama e LPS, as células musculares esqueléticas foram capazes de inibir a conversão de taquizoítas em bradizoítas. Inicialmente, acreditava-se que IFN-gama contribuísse para indução desta conversão, no entanto, descobriu-se que esta citocina atuava na inibição do estágio proliferativo do parasito e não no processo de estágio-conversão (Jones cols., 1975). Utilizando-se culturas primárias de astrócitos, Jones e cols. (1986)

reforçam que a presença de IFN-gama definitivamente não induz à formação de cistos em cultura, mas sim que esta citocina preveniu a lise celular pelas formas multiplicativas rápidas do *Toxoplasma*, permitindo desta forma a persistência do parasito em cultura por períodos mais longos. Apesar da imunidade humoral também ter um papel importante na infecção, a resposta celular IFN-dependente também é crucial na resistência do hospedeiro contra o parasito (Suzuki, 2002). O IFN-gama tem a capacidade de ativar macrófagos *in vitro* (Murray e cols., 1985; Black e cols., 1987) e *in vivo* (McCabe e cols., 1984) e macrófagos humanos inibem ou matam o parasito (Nathan e cols., 1985; Black e cols., 1987), tendo um papel importantíssimo na defesa do hospedeiro (Suzuki e cols., 1988). Estudos mais aprofundados devem ser desenvolvidos para o entendimento desta participação desempenhada pelas CME ativadas por LPS, em presença de IFN-gama exógeno, inibindo a conversão do *Toxoplasma*. Interessante seria avaliar a atividade toxoplasmacida pela CME, quantificando a proliferação do parasito nestas condições. Além disso, avaliar a produção de IFN endógeno pela CME e o balanço desta citocina antes e depois da infecção em presença de IFN exógeno, seria um dos primeiros passos para inferir o papel desta citocina na proteção das células musculares, impedindo a conversão e, conseqüentemente, o estabelecimento de uma infecção crônica pelo parasito. Apesar dos nossos dados referentes a conversão do *Toxoplasma* em presença de IFN exógeno, serem ainda preliminares, eles apontam para sua modulação negativa sobre a célula muscular na conversão do parasito e reforçam ainda mais a nossa hipótese de que o intrigante processo de diferenciação não deve ser uma resposta a estresses exógenos, e sim diretamente relacionada à célula hospedeira.

Os taquizoítos são os estágios do *Toxoplasma* mais extensivamente estudados e numerosos marcadores estão disponíveis. Como exemplo de moléculas especificamente expressas por taquizoítos podemos citar as isoenzimas ENO2 e LDH1, enquanto os bradizoítos expressam exclusivamente ENO1 e LDH2. Um anticorpo adicional, além dos já citados, foi também CC2 que reconhece uma proteína da parede do cisto (Ferguson, 2004). Uma outra abordagem metodológica utilizada na presente tese foi a técnica de RT-PCR em tempo real nas CMEs para avaliação da expressão relativa de genes específicos para cada estágio do *Toxoplasma*. A técnica de RT-PCR em tempo real é o método mais adequado para detecção e quantificação de níveis de expressão gênica oferecendo alta sensibilidade e reprodutibilidade (Pfaffl e cols., 2001). A expressão relativa dos genes ENO1 (específico de bradizoítos) e ENO2 (específico de taquizoítos) foi

baseada na expressão relativa para o gene para tubulina, com o objetivo de se considerar o aumento de mRNA devido a multiplicação do parasito ao longo da cinética e/ou por qualquer diferença relativa a isolamento de mRNA de amostras individuais. O gene ENO2 não apresentou grandes alterações durante a cinética de infecção. Em compensação, os níveis relativos a expressão do gene ENO1 aumentou continuamente ao longo dos seis dias de infecção, o que ratifica os altos níveis de estágio-conversão espontânea observados nas CMEs por imunofluorescência.

Cistos teciduais de *T. gondii* são preferencialmente encontrados no sistema nervoso central incluindo a retina e a musculatura esquelética de animais infectados (Dubey e col., 1998; Dzierszinski e cols., 2007). Um tropismo celular deste tipo deve resultar em parte de uma resposta antiparasítica inadequada ou reduzida nestes órgãos. O número de cistos no cérebro de camundongos depende da carga genética do MHC (Brown e McLeod, 1990), confirmando seu papel do MHC nos mecanismos de defesa imune na regulação do desenvolvimento dos cistos no cérebro. No entanto, fatores que determinam uma sobrevivência de longo termo do *T. gondii* no tecido muscular ainda não foi delineado. Nossos dados sugerem que deva existir um fator de impacto considerável tipo célula-específico, pelo menos como pré-requisito para a persistência do parasito, isto é, de bradizoítos na musculatura esquelética. Estudos mais aprofundados devem ser estabelecidos para se conhecer a extensão com que fatores imunológicos também regulam o número de cistos formados na musculatura esquelética. Em conclusão, células musculares esqueléticas proporcionam um nicho que dispara prontamente o desenvolvimento de bradizoítos sem a necessidade de estímulos de fatores de estresse externos. Nossa hipótese é que este fato explicaria, pelo menos em parte, a persistência preferencial nos tecidos de musculatura esquelética, *in vivo*.

Esse modelo celular poderá contribuir para uma melhor compreensão da biologia celular e molecular da conversão e da cistogênese do *Toxoplasma*, fornecendo subsídios: (i) que possam direcionar vias alternativas para uma quimioterapia de pacientes com toxoplasmose e, (ii) que levem à interrupção de uma das principais vias de transmissão do parasito através da ingestão de carne crua ou mal cozida entre os humanos.

O artigo de revisão intitulado "Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*" (Anexo 2), teve como referência os experimentos empregando uma grande diversidade de tipos celulares, que

exploraram as condições de indução da diferenciação: (i) através da manutenção das culturas em pH alcalino, (ii) pela adição de citocinas às culturas, (iii) sob condições de estresse nutricional. Os dados foram tabulados, considerando-se as condições de estresses mais conhecidas e destacando, por outro lado, os contrastes resultantes do sucesso e da efetividade de cada sistema em formar bradizoítos *in vitro*. O principal foco da revisão foi discutir a questão do papel das células hospedeiras na contribuição ou na interferência do processo de diferenciação do parasito e finalmente resgatar a questão de que o tipo celular também possa ser um fator determinante importante neste intrigante processo.

CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

- A expressão de proteínas músculo-específicas, tais como, Myf5, MyoD e desmina em CME são coincidentes com os diferentes estágios da miogênese reproduzidos *in vitro*, a partir de mioblastos isolados de embriões de camundongos;
- Altas taxas de diferenciação de taquizoítos-bradizoítos de *T. gondii* ocorrem espontaneamente em CMEs oriundas de cultura primária ou de linhagem celular indicando que a estágio-conversão do *Toxoplasma* ocorre independente de estímulos exógenos;
- O aumento da expressão de ENO1 (uma enolase específica ao estágio bradizoíta do *Toxoplasma*) em culturas infectadas por taquizoítos de *T. gondii* em associação com a expressão de proteína bradizoíta específico por imunofluorescência corroboram a sugestão de que a estágio-conversão espontânea ocorra em CME;
- Células de linhagem de fibroblasto mostraram um baixo percentual de vacúolos contendo bradizoítos de *Toxoplasma*, a partir de infecção com taquizoítos indicando que o tipo celular é determinante para disparar a conversão em bradizoítos;
- CMEs infectadas com taquizoítos de *T. gondii* e incubadas com IFN gama exógeno em presença de LPS não induziram a conversão dos parasitos em bradizoítos sugerindo que essa estratégia não se aplica em CME;
- Em resumo, as evidências de que a diferenciação para bradizoítos a partir de taquizoítos não necessita de fatores externos de estresse em CME, sugere que: (i) a estágio-conversão do *Toxoplasma* não seja uma resposta a fatores de estresse, e sim esteja relacionada ao tipo celular em que o parasito se encontra para desenvolver seu ciclo, e que (ii) fatores intrínsecos inerentes do tipo celular podem ser um pré-requisito para a conversão e/ou persistência do parasito no tecido muscular.

BIBLIOGRAFIA

VIII. Bibliografia

- Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. PLoS Pathog 2005; 1 e 17.
- Ascenzi P, Bocedi A, Gradoni L. Do neuroglobin and myoglobin protect *Toxoplasma gondii* from nitrosative stress? IUBMB Life. 2005;57(10):689-91.
- Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Orefice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. Emerg Infect Dis 2003;9:55–62.
- Barbosa HS, Pereira MCS, Meirelles MNL. Protocolos de culturas primárias. Cap. 18.2 In: Doença de Chagas:Manual para experimentação animal, Tania Araújo-Jorge & Solange Lisboa de Castro (org), Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ , 2000;pp 297-313.
- Barbosa HS, Silva MFF, Guimarães EV, Carvalho L, Rodrigues RM. Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear localization. J Parasitol 2005;91:182-184.
- Barbosa HS. Why studies on invasion of host cell by *Trypanosoma cruzi* using established cell lines or primary cell cultures give conflicting results? Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94 (Suppl 1):153-4.
- Benenson MW, Takafuji ET, Lemon SM, Greenup RL, Sulzer AJ. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. N Engl J Med 1982;307(11):666-9.
- Berdoy M, Webster JP, Macdonald DW. Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. Proc Biol Sci. 2000 Aug 7;267(1452):1591-4.
- Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. Semin Cell Dev Biol. 2005;16:585-95. Review
- Bhopale GM. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. Microbes Infect. 2003 Apr;5(5):457-62. Review.
- Biggs BA, Hewish M, Kent S, Hayes K, Crowe SM. HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii*. J Immunol. 1995 Jun 1;154(11):6132-9.

- Black CM, Catterall JR, Remington JS. In vivo and in vitro activation of alveolar macrophages by recombinant interferon-gamma. *J Immunol*. 1987 Jan 15;138(2):491-5.
- Black MW, Arrizabalaga G, Boothroyd JC. Ionophore-resistant mutants of *Toxoplasma gondii* reveal host cell permeabilization as an early event in egress. *Mol Cell Biol* 2000;24:9399-408.
- Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:607-23.
- 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* 1993b;79:485-7.
- Bohne W, Heesemann J, Gross U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect Immun* 1993a;61:1141-5.
- Bohne W, Heesemann J, Gross U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect Immun* 1994;62:1761-7.
- Bohne W, Holpert M, Gross U. Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology* 1999;201:248-54.
- Bohne W, Parmley SF, Yang S, Gross U. Bradyzoite-specific genes. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;219:81-91.
- Bohne W, Roos DS. Stage-specific expression of a selectable marker in *Toxoplasma gondii* permits selective inhibition of either tachyzoites or bradyzoites. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 88: 115-126.
- Bohne W, Roos DS. Stage-specific expression of a selectable marker in *Toxoplasma gondii* permits selective inhibition of either tachyzoites or bradyzoites. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 88: 115-126.
- 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* 1997;352(1359):1347-54.

- Boothroyd JC, Dubremetz JF. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Jan;6(1):79-88. Review.
- Boothroyd JC, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol* 2002;5(4):438-42.
- Boothroyd JC, Hehl A, Knoll LJ, Manger ID. The surface of *Toxoplasma*: more and less. *Int J Parasitol*. 1998 Jan;28(1):3-9. Review.
- Brown CR, McLeod R. Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol*. 1990 Nov 15;145(10):3438-41.
- Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat*. 2003 Jan;202(1):59-68. Review.
- Buckingham M. Muscle differentiation. Which myogenic factors make muscle? *Curr Biol*. 1994 Jan 1;4(1):61-3.
- Buckingham M. Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. *C R Biol*. 2007 Jun-Jul;330(6-7):530-3. Epub 2007 Jun 13. Review.
- Bugnard E, Zaal KJ, Ralston E. Reorganization of microtubule nucleation during muscle differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2005;60:1-13.
- Bugnard E, Zaal KJ, Ralston E. Reorganization of microtubule nucleation during muscle differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2005;60:1-13.
- Capetanaki Y, Milner DJ. Desmin cytoskeleton in muscle integrity and function. *Subcell Biochem* 1998;31:463-495. Review.
- Carruthers VB, Giddings OK, Sibley LD. Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cell Microbiol* 1999a;1(3):225-35.
- Carruthers VB, Sibley LD. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol* 1999; 31:421-428.
- Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 1997;73:114-23.
- Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop* 2002;81:111-122.
- Carruthers VB. Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. *Int J Parasitol* 2006;36(5):595-600.

- Carvalho L, De Souza W. Carbohydrate-containing molecules found in rhoptries are released during penetration of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* in host cells. *Biocell* 1997;21:25-29.
- Carvalho L, De Souza W. Carbohydrate-containing molecules found in rhoptries are released during penetration of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* in host cells. *Biocell* 1997;21:25-29.
- Carvalho L, De Souza W. Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during internalization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *J Protozool* 1989;36:164-170.
- Carvalho L, De Souza W. Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during internalization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *J Protozool* 1989;36:164-170.
- Carvalho L, De Souza, W. Internalization of surface anionic sites and phagosome-lysosome fusion during interaction of *Toxoplasma gondii* with macrophages. *Eur J Cell Biol* 1990;51:211-219.
- Carvalho L, Yan CY, De Souza W. The effect of various digestive enzymes on the interaction of *Toxoplasma gondii* with macrophage. *Parasitol Res* 1993;79:114-118.
- Carvalho TM, Ferreira AG, Coimbra ES, Rosestolato CT, De Souza W. Distribution of cytoskeletal structures and organelles of the host cell during evolution of the intracellular parasitism by *Trypanosoma cruzi*. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1999; 31:325-333.
- Chang WS, Serikawa K, Allen K, Bentley D. Disruption of pioneer growth cone guidance in vivo by removal of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored cell surface proteins. *Development* 1992;114:507-519.
- Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004;84:209-238. Review.
- Charron AJ, Sibley LD. Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic* 2004;5:855-867.

- Chen L, Burgunder JM. In vitro developmental expression of dystroglycan and laminin- α 2 in human skeletal muscle. *Cell Biol Int* 2005;29:506-513.
- Choi J, Costa ML, Mermelstein CS, Chagas C, Holtzer S, Holtzer H. MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7988-7992.
- Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002;18:637-706. Review.
- Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003;422(6927):37-44.
- Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ* 2000;321:142-147.
- Coppens I, Dunn JD, Romano JD, Pypaert M, Zhang H, Boothroyd JC, Joiner KA. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* 2006;125(2):261-74.
- Coppin A, Dzierszynski 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* 2003;85(3-4):353-61.
- Costa ML, Escaleira R, Cataldo A, Oliveira F, Mermelstein CS. Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:1819-1830. Review.
- Costa ML, Escaleira R, Cataldo A, Oliveira F, Mermelstein CS. Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:1819-1830. Review.
- Costa ML, Escaleira R, Manasfi M, de Souza LF, Mermelstein CS. Cytoskeletal and cellular adhesion proteins in zebrafish (*Danio rerio*) myogenesis. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:1117-1120.

- Costa ML, Escaleira R, Manasfi M, de Souza LF, Mermelstein CS. Cytoskeletal and cellular adhesion proteins in zebrafish (*Danio rerio*) myogenesis. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:1117-1120.
- Costa ML, Escaleira RC, Rodrigues VB, Manasfi M, Mermelstein CS. Some distinctive features of zebrafish myogenesis based on unexpected distributions of the muscle cytoskeletal proteins actin, myosin, desmin, alpha-actinin, troponin and titin. *Mech Dev* 2002;116:95-104.
- Costa ML, Escaleira RC, Rodrigues VB, Manasfi M, Mermelstein CS. Some distinctive features of zebrafish myogenesis based on unexpected distributions of the muscle cytoskeletal proteins actin, myosin, desmin, alpha-actinin, troponin and titin. *Mech Dev* 2002;116:95-104.
- Darcy F, Santoro, F. Toxoplasmosis. In: Kierszenbaum F (ed), *Parasitic infections and the immune system*. 1994;163-200. Academic Press, Inc.
- Darde ML, Bouteille B, Leboutet MJ, Loubet A, Pestre-Alexandre M. *Toxoplasma gondii*: ultrastructural study of cystic formations observed in human fibroblast culture. *Ann Parasitol Hum Comp* 1989;64:403-11.
- De Carvalho L, De Souza W. Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during internalization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *J Protozool* 1989;36:164-70.
- De Carvalho L, Yan CY, De Souza W. The effect of various digestive enzymes on the interaction of *Toxoplasma gondii* with macrophage. *Parasitol Res* 1993;79(2):114-8.
- De Carvalho TU, Souto-Padron T, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: surface charge and freeze-fracture of amastigotes. *Exp Parasitol* 1985;59:12-23.
- De Haan RL. Development of pacemaker tissue in the embryonic chick heart cells in tissue culture. *Ann N Y Acad Sci* 1965;127:7-18.
- De Lucca C. Effects of mode of culture and nutrient medium on cyclic variations in enzyme activities of mammalian cells cultured *in vitro*. *Exp Cell Res* 1966;43:39-50.
- De Melo EJ, Carvalho TM, De Souza W. Behaviour of microtubules in cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Biocell*. 2001;25(1):53-9.

- De Melo EJT, De Souza W. A cytochemistry study of the inner membrane complex of the pellicle of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Res 1997;83:252-256.
- Dedieu S, Poussard S, Mazeret G, Grise F, Dargelos E, Cottin P, Brustis JJ. Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization. Exp Cell Res 2004;292:187-200.
- Delgado, EF, Geesink, GH, Marchello, JA, Goll, DE, Koohmaraie, M. Properties of myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of callipyge and normal sheep. J Anim Sci 2001;79:2097-2107.
- 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 1996;137(1):103-8.
- Derouin F. Anti-toxoplasmosis drugs. Curr Opin Investig Drugs 2001;2:1368-1374.
- Desmonts G, Couvreur J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. N Engl J Med 1974;290(20):1110-6.
- Długońska H, Gatkowska J, Kur J, Gasior A. The vaccines against toxoplasmosis--current status of the studies. Wiad Parazytol. 2007;53(3):195-201. Review.
- Dobrowolski JM, Sibley LD. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. Cell. 1996;84(6):933-9.
- Dodson MV, McFarland DC, Grant AL, Doumit ME, Velleman SG. Extrinsic regulation of domestic animal-derived satellite cells. 1996;13:107-126.
- Dodson MV, McFarland DC, Grant AL, Doumit ME, Velleman SG. Extrinsic regulation of domestic animal-derived satellite cells. 1996;13:107-126.
- Donald RG, Roos DS. Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Dec 15;90(24):11703-7.
- Downing KH, Nogales E. Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions. Curr Opin Struct Biol. 1998;8:785-791. Review.
- Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Pres Inc 1988;1-122. Boca Raton, Fla.

- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev 1998;11:267-299. Review.
- Dubey JP, Miller S, Powell EC, Anderson WR. Epizootiologic investigations on a sheep farm with *Toxoplasma gondii*-induced abortions. J Am Vet Med Assoc. 1986 Jan 15;188(2):155-8.
- Dubey JP, Murrell KD, Fayer R. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs fed oocysts. Am J Vet Res. 1984 Oct;45(10):1941-3.
- Dubey JP, Shen SK, Kwok OC, Frenkel JK.
- Dubey JP, Speer CA, Shen SK, Kwok OC, Blixt JA. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. J Parasitol 1997;83:870-82.
- Dubey JP. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in caprine livers and public health significance of toxoplasmosis in goats. J Am Vet Med Assoc. 1980 Dec 15;177(12):1203-7.
- Dubey JP. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of equids fed oocysts. Am J Vet Res. 1985 Aug;46(8):1753-4.
- Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 1998a;28:1019-24.
- Dubey JP. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. J Eukaryot Microbiol 1997;44:592-602.
- Dubey JP. Isolation of encysted *Toxoplasma gondii* from muscles of mule deer in Montana. J Am Vet Med Assoc. 1982 Dec 15;181(12):1535.
- Dubey JP. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. Am J Vet Res 1988;49:910-3.
- Dubey JP. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. J Parasitol 2001;87:215-19.
- Dubey JP. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. Parasitology 1998a;116(pt 1):43-50.

- Dubey JP. *Toxoplasma gondii* infection in rodents and insectivores from Montana. J Wildl Dis. 1983 Apr;19(2):149-50.
- Dubey JP. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. J Parasitol 1998b;84:862-865.
- Dubey JP. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidian of humans and animals. In: Kreier JP, editor. Parasitic protozoa, New York: Academic Press Inc; 1993. v. 6. p. 1-158.
- Dubey JP. Unexpected oocyst shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: in vivo stage conversion and strain variation. Vet Parasitol 2005;133:289–98.
- Dubremetz JF, Achbarou A, Bermudes D, Joiner KA. Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. Parasitol Res 1993;79(5):402-8.
- Dzierszynski F, Nishi M, Ouko L, Roos DS. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. Eukaryot Cell 2004;3(4):992-1003.
- Dzierszynski F, Pepper M, Stumhofer JS, LaRosa DF, Wilson EH, Turka LA, Halonen SK, Hunter CA, Roos DS. Presentation of *Toxoplasma gondii* antigens via the endogenous major histocompatibility complex class I pathway in nonprofessional and professional antigen-presenting cells. Infect Immun. 2007 ;75(11):5200-9.
- Dzierszynski 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. 1999 27;274(35):24888-95.
- Egea N, Lang-Unnasch N. Phylogeny of the large extrachromosomal DNA of organisms in the phylum Apicomplexa J Eukaryot Microbiol. 1995;42(6):679-84. Erratum in: J Eukaryot Microbiol. 1996 Mar-Apr;43(2):158.
- Ellis J, Sinclair D, Morrison D. Microarrays and stage conversion in *Toxoplasma gondii*. Trends Parasitol. 2004 Jun;20(6):288-95. Review.
- Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? Trends Parasitol. 2002 Aug;18(8):355-9.
- Ferguson DJ. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. Int J Parasitol 2004;34(3):347-360.

- Ferreira-Da-Silva, MF; Barbosa, HS; Gross, U.; Lueder CGK. Stress-related and spontaneous differentiation of *Toxoplasma gondii* Mol. Byossistem, 2008. DOI 10.1039/b800520f.
- Foulon W, Pinon JM, Stray-Pedersen B, Pollak A, Lappalainen M, Decoster A, Villena I, Jenum PA, Hayde M, Naessens A. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: a multicenter evaluation of different diagnostic parameters. Am J Obstet Gynecol. 1999 Oct;181(4):843-7.
- Fox BA, Gigley JP, Bzik DJ. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. Int J Parasitol. 2004
- Frenkel JK, Dubey JP, Hoff RL. Loss of stages after continuous passage of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni*. J Protozool 1976;23(3):421-4.
- Frenkel JK. Letter: Cytomegalovirus infection and toxoplasma. Am J Dis Child 1973;126:860-1.
- Frenkel JK. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. J Am Vet Med Assoc 1990;196:233-40.
- Frenkel JK.. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. J Am Vet Med Assoc. 1990 Jan 15;196(2):233-40.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. Eur J Immunol. 1992 Oct;22(10):2501-6.
- Gherardi R, Baudrimont M, Lionnet F, Salord JM, Duvivier C, Michon C, Wolff M, Marche C. Skeletal muscle toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: a clinical and pathological study. Ann Neurol 1992; 32:535-542.
- Gross U, Bohne W, Lüder CGK, Lugert R, Seeber F, Dittrich C, Pohl F, Ferguson DJP. Regulation of developmental differentiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. J Eukaryot Microbiol 1996;43:114S-116S.
- Gross U, Bormuth H, Gaissmaier C, Dittrich C, Krenn V, Bohne W, Ferguson DJ. Monoclonal rat antibodies directed against *Toxoplasma gondii* suitable for

- studying tachyzoite-bradyzoite interconversion *in vivo*. Clin Diagn Lab Immunol 1995;2:542-48.
- Gross U, Kempf MC, Seeber F, Lüder CG, Lugert R, Bohne W. Reactivation of chronic toxoplasmosis: is there a link to strain-specific differences in the parasite? Behring Inst Mitt. 1997 Mar;(99):97-106. Review.
- Gross U, Pohl F. Influence of antimicrobial agents on replication and stage conversion of *Toxoplasma gondii*. Curr Top Microbiol Immunol 1996;219:235-45.
- Guimarães EV, Carvalho L, Barbosa HS. An Alternative technique to reveal polysaccharides in *Toxoplasma gondii* tissue cysts. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003;98(7):915-7.
- Guimarães EV, de Carvalho L, Barbosa HS. Primary culture of skeletal muscle cells as a model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis. J Parasitol. 2008 Feb;94(1):72-83.
- Haas TA, Plow EF. Integrin-ligand interactions: a year in review. Curr Opin Cell Biol. 1994 Oct;6(5):656-62. Review.
- Haas TA, Plow EF. Integrin-ligand interactions: a year in review. Curr Opin Cell Biol. 1994;6:656-662. Review.
- Harboe A, Erichsen S., Acta Pathol Microbiol Scand. 1954; 35(5):495-502. Toxoplasmosis in chickens. 3. Attempts to provoke a systemic disease in chickens by infection with a chicken strain and a human strain of toxoplasma.
- Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect. 2002 Oct;8(10):634-40. Review.
- Hoare CA. The developmental stages of *Toxoplasma*. J Trop Med Hyg. 1972 Mar;75(3):56-8.
- Hoff RL, Dubey JP, Behbehani AM, Frenkel JK. *Toxoplasma gondii* cysts in cell culture: new biologic evidence. J Parasitol 1977;63:1121-4.
- Hogan MJ, Yoneda C, Feeney L, Zweigart P, LEWIS A.. Morphology and culture of *Toxoplasma*. Trans Am Ophthalmol Soc. 1960;58:167-87.
- Ho-Yen DO, Joss AW Congenital toxoplasmosis. BMJ 1992;305:651-652.
- Inestrosa NC. Differentiation of skeletal muscle cells in culture. Cell Struct Funct 1989;28:55-105.
- Infection and immunity with the RH strain of *Toxoplasma gondii* in rats and mice. J Parasitol. 1999 Aug;85(4):657-62.

- Jackson MH, Hutchison WM. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv Parasitol* 1989;28: 55-105.
- Jacobs L. *Toxoplasma* and toxoplasmosis. *Adv Parasitol* 1967;5:1-45.
- Jerome ME, Radke JR, Bohne W, Roos DS, White MW. *Toxoplasma gondii* bradyzoites form spontaneously during sporozoite-initiated development. *Infect Immun*. 1998 Oct;66(10):4838-44.
- Joiner KA, Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. *Infect Immun*. 1993 Apr;61(4):1169-72. Review.
- Joiner KA, Roos DS. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J Cell Biol* 2002;157:557-63.
- Jones TC, Len L, Hirsch JG. Assessment in vitro of immunity against *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med*. 1975 Feb 1;141(2):466-82.
- Jones TC, Bienz KA, Erb P. In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. *Infect Immun* 1986;51:147-56.
- Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv* 2001;56:296-305.
- Keeley A, Soldati D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol* 2004;14(10):528-32.
- Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol* 2004;34(3):423-32.
- Kim K, Soldati D, Boothroyd JC. Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science*. 1993 Nov 5;262(5135):911-4.
- Kim K. Time to screen for congenital toxoplasmosis? *Clin Infect Dis*. 2006 May 15;42(10):1395-7. Epub 2006 Apr 11.
- Köhler S. Multi-membrane-bound structures of Apicomplexa: II. the ovoid mitochondrial cytoplasmic (OMC) complex of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Parasitol Res*. 2006 Mar;98(4):355-69.
- Köhler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJ, Palmer JD, Roos DS. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*. 1997 Mar 7;275(5305):1485-9.

- Konigsberg IR, Sollmann PA, Mixter LO. The duration of the terminal G1 of fusing myoblasts. *Dev Biol* 1978;63:11-26.
- Konigsberg IR. Clonal analysis of myogenesis. *Science* 1963;140:1273-1284.
- Lane A, Soete M, Dubremetz JF, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: appearance of specific markers during the development of tissue cysts *in vitro*. *Parasitol Res* 1996;82:340-6.
- Lindsay DS, Dubey JP, Blagburn BL, Toivio-Kinnucan M. Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. *J Parasitol* 1991;77:126-32.
- 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* 1993a;54:1663-7.
- Lindsay DS, Toivio-Kinnucan MA, Blagburn BL. Ultrastructural determination of cystogenesis by various *Toxoplasma gondii* isolates in cell culture. *J Parasitol* 1993b;79:289-92.
- Lüder CG, Giraldo-Velasquez M, Sendtner M, Gross U. *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Exp Parasitol*. 1999; 93:23-32.
- Lüder CG, Gross U. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;289:219-37. Review
- Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 1992;15:211-22.
- Luft BJ, Pedrotti PW, Engleman EG, Remington JS. Induction of antigen-specific suppressor T cells during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis*. 1987 May;155(5):1033-7.
- McHugh TD, Gbewonyo A, Johnson JD, Holliman RE, Butcher PD. Development of an *in vitro* model of *Toxoplasma gondii* cyst formation. *FEMS Microbiol Lett* 1993;114:325-32.
- McHugh TD, Holliman RE, Butcher PD. The *in vitro* model of tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today* 1994;(7):281-5.

- Mehlhorn H, Frenkel JK. Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris*, and *Hammondia hammondi* in skeletal muscle of mice. *J Parasitol* 1980;66:59-67.
- Sanger JW, Kang S, Siebrands CC, Freeman N, Du A, Wang J, Stout AL, Sanger JM. How to build a myofibril. *J Muscle Res Cell Motil* 2006;26:343-354.
- Molestina RE, Sinai AP. Detection of a novel parasite kinase activity at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane capable of phosphorylating host I κ B α . *Cell Microbiol.* 2005 Mar;7(3):351-62.
- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004;363(9425):1965-76.
- Mordue DG, Desai N, Dustin M, Sibley LD. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med* 1999;190:1783-1792.
- Mordue DG, Desai N, Dustin M, Sibley LD. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med* 1999;190:1783-1792.
- Morrisette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002 Mar;66(1):21-38; table of contents. Review.
- Nichols BA, Chiappino ML. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J Protozool* 1987;34(2):217-26.
- Nichols BA, O'Connor GR. Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. *Lab Invest* 1981;44:324-335.
- Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci* 1908;147:763-6.
- Payne TM, Molestina RE, Sinai AP (2003) Inhibition of caspase activation and a requirement for NF- κ B function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. *J Cell Sci* 116: 4345–4358.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1;30(9):e36.

- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45.
- Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors invertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:747-83.Review.
- Radke JR, Behnke MS, Mackey AJ, Radke JB, Roos DS, White MW. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. *BMC Biol.* 2005 Dec 2;3:26.
- Radke JR, Donald RG, Eibs A, Jerome ME, Behnke MS, Liberator P, White MW. Changes in the expression of human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma gondii* growth and development. *PLoS Pathog.* 2006 Oct;2(10):e105.
- Radke JR, Guerini MN, Jerome M, White MW. A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 131(2):119-27.
- Remington JS, Cavanaugh EN. Isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain. *N Engl J Med* 1965;273:1308-1310.
- Remington JS, Gentry LO. Acquired toxoplasmosis: infection versus disease. *Ann NY Acad Sci* 1970;174:1006–17.
- Remington JS, McLeod R, Desmonts, G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* Philadelphia: W.B. Saunders; 1995. p. 140-267.
- Roos DS, Crawford MJ, Donald RG, Kissinger JC, Klimczak LJ, Striepen B. Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Curr Opin Microbiol.* 1999 Aug;2(4):426-32. Review.
- Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet.* 2000 Jan;57(1):16-25. Review.
- Sarciron ME, Gherardi A. Cytokines involved in Toxoplasmic encephalitis. *Scand J Immunol.* 2000 Dec;52(6):534-43. Review.
- Schlüter D, Kwok LY, Lütjen S, Soltek S, Hoffmann S, Körner H, Deckert M. Both lymphotoxin-alpha and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. *J Immunol.* 2003 Jun 15;170(12):6172-82.
- Schlüter D, Deckert M, Hof H, Frei K. *Toxoplasma gondii* infection of neurons induces neuronal cytokine and chemokine production, but gamma interferon-

and tumor necrosis factor-stimulated neurons fail to inhibit the invasion and growth of *T. gondii*. *Infect Immun*. 2001 Dec;69(12):7889-93.

- Seeber F. Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2003 Jun;3(2):99-109. Review.
- Shainberg A, Yagil G, Yaffe D. Control of myogenesis *in vitro* by Ca^{++} concentration in nutritional medium. *Exptl Cell Res* 1969;58:163-167.
- Sinai AP, Payne TM, Carmen JC, Hardi L, Watson SJ, et al. (2004) Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 34: 381–391.
- Soète M, Camus D, Dubremetz JF. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii in vitro*. *Exp Parasitol* 1994;78:361-70.
- Soète M, Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion *in vitro*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;219:76-80.
- Soète M, Fortier B, Camus D, Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. *Exp Parasitol* 1993;76:259-264.
- Speer CA, Dubey JP. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *Int J Parasitol* 2005;35(2):193-206.
- Stanley AC, Buxton D, Innes EA, Huntley JF Intranasal immunisation with *Toxoplasma gondii* tachyzoite antigen encapsulated into PLG microspheres induces humoral and cell-mediated immunity in sheep. *Vaccine*. 2004 Sep 28;22(29-30):3929-41...
- Striepen B, Jordan CN, Reiff S, van Dooren GG. Building the perfect parasite: cell division in apicomplexa. *PLoS Pathog*. 2007 Jun;3(6):e78. Review.
- Suzuki Y, Conley FK, Remington JS. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J Immunol* 1989;143:2045-50.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000;30: 1217-58.

- Tomavo S, Fortier B, Soete M, Ansel C, Camus D, Dubremetz JF. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 1991;59:3750-3.
- Tuckwell DS, Humphries MJ. Molecular and cellular biology of integrins. *CriRev Oncol Hematol* 1993;15:149-171. Review.
- Wan KL, Carruthers VB, Sibley LD, Ajioka JW. Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 84(2): 203-214.
- Webster JP. The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. *Schizophr Bull.* 2007 May;33(3):752-6. Epub 2007 Jan 11. Review.
- Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci* 2000;5:D391-405.
- Weiss LM, Laplace D, Takvorian PM, Tanowitz HB, Cali A, Wittner M. Cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *J Eukaryot Microbiol* 1995;42:150-7.
- Witting PA. Learning capacity and memory of normal and *Toxoplasma*-infected laboratory rats and mice. *Z Parasitenkd.* 1979;61(1):29-51.
- Yablonka-Reuveni Z, Day K, Vine A, Shefer G. Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. *J Anim Sci.* 2008 Apr;86(14 Suppl):E207-16. Epub 2007 Sep 18. Review.
- Yaffe D, Saxel O. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation* 1977; 7(3): 159-166.
- Yaffe D. Rat skeletal muscle cells. In: Kruse Jr PF, Patterson Jr MK, editors. *Tissue culture: methods and applications*. New York: Ac. Press; 1973. p. 106-114.
- Yaffe D. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 61(2): 477-483.
- Yahiaoui B, Dzierszynski F, Bernigaud A, Slomianny C, Camus D, Tomavo S. Isolation and characterization of a subtractive library enriched for developmentally regulated transcripts expressed during encystation of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 1999 Apr 30;99(2):223-35.
- Zhang YW, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: reactivity of murine sera against tachyzoite and cyst antigens via FAST-ELISA. *Int J Parasitol.* 1995 May;25(5):637-40.

ANEXOS

ANEXO I

1 SHORT COMMUNICATION

2

3 ***Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion in skeletal muscle cells**
4 **in the absence of exogenous stress factors**

5

6

7

8

9 **Marialice da Fonseca Ferreira-da-Silva^{1,2}, Anna C. Takács¹, Helene S. Barbosa², Uwe**
10 **Gross¹, and Carsten G. K. Lüder^{1*}**

11

12 ¹Institute for Medical Microbiology, Georg-August-University, Kreuzberggring 57, 37075

13 Göttingen, Germany; ²Laboratory of Structural Biology, Oswaldo Cruz Institut, Oswaldo Cruz

14 Foundation, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

15

16

17

18

19

20

21

22

23 *Corresponding author: Carsten G. K. Lüder, Institute for Medical Microbiology, Georg-August-
24 University, Kreuzberggring 57, 37075 Göttingen, Germany. Tel.: +49-551-395869; Fax: +49-551-
25 395861; e-mail: clueder@gwdg.de

26

27 **Abstract**

28 *Toxoplasma gondii* is one of the most common eukaryotic parasites and an important
29 opportunistic pathogen of humans. The interconversion from proliferative tachyzoites into
30 quiescent encysted bradyzoites plays pivotal roles in the lifelong persistence of *T. gondii* in its
31 host and the pathogenesis of toxoplasmosis. Stage conversion and persistence in skeletal muscle
32 tissue may be particularly important for the food-borne transmission of *T. gondii* to humans via
33 raw or undercooked meat products. Here we have followed the transition of tachyzoites to
34 bradyzoites after infection of skeletal muscle cells (SkMC). Primary murine myoblasts were
35 differentiated to multinucleated syncytial myotubes that displayed regular contractions in vitro
36 and expressed myogenic markers Myf5 and MyoD. Tachyzoites of *T. gondii* invaded SkMC
37 within 4 hours of infection and started to replicate within 24 hours of infection. Remarkably,
38 intracellular tachyzoites readily differentiated to bradyzoites in SkMC without the need of
39 exogenous stress factors. Double immunofluorescence labelling revealed significantly higher
40 percentages of bradyzoite-containing vacuoles in SkMC than in murine fibroblasts at 24 hours
41 until 6 days after infection. Furthermore, transcript levels of bradyzoite-specific ENO1 but not
42 tachyzoite-specific ENO2 strongly increased in *T. gondii*-infected SkMC until 6 days of
43 infection. These findings indicate that the commitment of *T. gondii* to differentiate to
44 bradyzoites in SkMC does not require exogenous stress factors but could be rather regulated by
45 cell-type specific factors.

46

47

48 **Key words:** *Toxoplasma gondii*, skeletal muscle cell, stage conversion, bradyzoite, parasite
49 persistence.

50

51

52

53 **Introduction**

54 The differentiation of fast-replicating tachyzoites of the intracellular protozoan parasite
55 *Toxoplasma gondii* into the dormant bradyzoite stage plays pivotal roles in the formation of
56 tissue cysts, the life-long persistence of viable parasites in the host, and the transmission between
57 mammalian and avian hosts including humans (Tenter et al., 2000). It is also a major prerequisite
58 for life-threatening diseases due to *T. gondii*, e.g. reactivated toxoplasmosis in
59 immunocompromized patients (Montoya and Liesenfeld, 2004). The early events of the stage
60 conversion are thought to be of critical importance, during which the expression of tachyzoite-
61 specific genes is switched off and that of bradyzoite-specific ones starts to be up-regulated
62 (Tomavo and Weiss, 2007). In vitro models of the tachyzoite-bradyzoite differentiation have
63 been established using a variety of stress conditions including treatment of host cells with
64 gamma interferon or mitochondrial inhibitors (Bohne et al, 1994), or by employing alkaline pH
65 or high temperature (Soète et al., 1994). Although the employment of artificial stress conditions,
66 e.g. alkaline pH considerably facilitated analyses of the process of *Toxoplasma* stage conversion
67 and underlying mechanisms, we, nevertheless, have to admit that it may not mimic those
68 conditions required for stage conversion during the natural course of infection.

69 Tissue cysts containing bradyzoites of *T. gondii* are found in multiple organs of the host but
70 appear to preferentially develop in neural and muscular tissue (Dubey et al., 1998). The preferred
71 distribution of tissue cysts in brain and muscle may be facilitated by limited or non-canonical
72 immune responses in these tissues (Streilein, 1995; Wiendl et al., 2005). Alternatively, organ or
73 cell type-specific factors which appropriately trigger high levels of stage conversion and tissue
74 cyst formation in some organs but not in others might also be involved. Stage conversion, tissue
75 cyst formation, and host responses have been extensively studied in the brains of infected mice
76 and rats in vivo and in neural cells in vitro. In contrast, the requirements that regulate the
77 development of bradyzoites and tissue cysts in muscle tissue have not yet been investigated.
78 However, this issue is a matter of major concern since cysts in muscle tissue are the prerequisite

79 for transmission of *T. gondii* via the consumption of raw or undercooked meat products to
80 humans. Characterizing the stage conversion of *T. gondii* within myocytes may thus not only
81 further our knowledge on the mechanisms which determine parasite persistence in a
82 physiological type of cell but might also lead to novel strategies to reduce the risk of food-borne
83 transmission to humans. We, therefore, established primary skeletal muscle cells as a model to
84 study the development of *T. gondii* in vitro (Barbosa et al., 2000; Guimaraes et al., 2008).
85 Herein, we demonstrate that *T. gondii* tachyzoites readily convert to bradyzoites in skeletal
86 muscle cells without the need of exogenous stress factors. This suggests cell type-specific
87 mechanisms which may be responsible for the preferential tissue cyst formation of *T. gondii* in
88 muscular tissue.

89

90

91 **Materials and methods**

92

93 **Isolation and culture of skeletal muscle cells**

94 Thigh muscles of 18-20 days old NMRI mouse embryos were minced in Ringer solution and
95 incubated 5-7 times for 5 min each in PBS containing 0.05% trypsin and 0.01% EDTA. Tissue
96 digestion was stopped by the addition of 10% fetal bovine serum in Dulbecco's modified Eagle
97 medium (DMEM) at 4°C. After centrifugation, cells were incubated for 30 min in DMEM
98 supplemented with 15% horse serum, 2% fetal calf serum, 1 mM L-glutamine, 100 U/ml
99 penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Thereafter, non-adherent cells enriched for myoblasts
100 were seeded at 3×10^4 /well in 24-well plates containing coverslips for immunofluorescence
101 analysis and 1×10^5 /well in 6-well plates for RNA extraction. In order to assure long term
102 attachment of skeletal muscle cells, the culture plates had been previously incubated overnight
103 with 0.5 mg/ml poly-L-ornithine hydrobromide in 150 mM boric acid-NaOH, pH 8.3 and then
104 coated with 15 µg/ml mouse laminin for several hours. Cultures were maintained for 4-5 days in

105 order to allow myogenic differentiation (Barbosa et al., 2000). As controls, L929 murine
106 fibroblasts were cultivated in DMEM containing 10% FCS, 1 mM sodium pyruvate, non-
107 essential amino acids, and antibiotics.

108

109 ***Toxoplasma* parasites and infection**

110 Tachyzoites of the mouse-avirulent *T. gondii* type II strain NTE were propagated in L929
111 fibroblasts as host cells. For infection of skeletal muscle cells, tachyzoites were harvested from
112 L929 cocultures after initiation of host cell lysis. Briefly, contaminating host cells were pelleted
113 by centrifugation at $35 \times g$ for 5 min. The supernatant was then centrifuged at $1350 \times g$ for 10
114 min, the parasites were washed once and resuspended in DMEM supplemented with 10% FCS
115 and antibiotics. Skeletal muscle cells and control fibroblasts were infected with *T. gondii*
116 tachyzoites at a parasite to host cell ratio of 1:1.

117

118 **Immunofluorescence staining**

119 In order to determine tachyzoite-bradyzoite interconversion, *T. gondii*-infected cells were fixed
120 at different time points after infection using 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate
121 buffer. Cells were quenched for 10 min in 50 mM NH_4Cl in PBS, pH 7.4 and were then
122 permeabilized for 1 hour with 0.1 mg/ml saponin in PBS containing 1% bovine serum albumin
123 (BSA). Thereafter, cells were incubated simultaneously with CC2 rat monoclonal antibody
124 recognizing bradyzoite-containing but not tachyzoite-containing PVs (Gross et al., 1995) along
125 with polyclonal rabbit anti-*Toxoplasma* serum for 1 hour. Immune complexes were visualized
126 using Cy2-conjugated donkey F(ab')₂ fragments anti-rat IgG and Cy3-conjugated donkey F(ab')₂
127 fragments anti-rabbit IgG. Cells were mounted in Mowiol and analysed by confocal laser
128 scanning microscopy. In order to determine myogenic differentiation, non-infected primary
129 skeletal muscle cells were fixed and processed as described above. Cells were labelled with 5

130 $\mu\text{g/ml}$ mouse anti-MyoD (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) and Cy3-conjugated donkey
 131 F(ab')₂ fragments anti-mouse IgG.

132

133 **Quantitative and semi-quantitative RT-PCR analyses**

134 Total RNA was isolated using the GenElute Miniprep kit (Sigma, Deisenhofen, Germany).

135 Following reverse transcription, serial dilutions of cDNA were amplified by quantitative real-

136 time PCR in a LightCycler with the SYBR Green FastStart DNA Master^{Plus} Set (Roche,

137 Mannheim, Germany) using the following *T. gondii*-specific primer pairs: tubulin forward: 5'-

138 CGCCACGGCOGCTACCTGACT-3'; tubulin reverse: 5'-TACGCGCCTCCTCTGCACCC -

139 3'; ENO2 forward: 5'-AGCGGCGCATCCACTGGCATCTAC-3'; ENO2 reverse: 5'-

140 AACGGGACGGGCATTACCATCTTG-3'; ENO1 forward: 5'-

141 CGAGGGGTGGCTGAAAAAGTATCC-3'; ENO1 reverse 5'-

142 CAGCGAAGGCCACGACAAG-3'. Data were analyzed using the REST-MCS 2006 software

143 (Pfaffl et al., 2002). Briefly, the relative gene expression levels were calculated as the fold

144 change between 4 hours after infection (control) and later time points (sample) using the formula

145 $\text{Ratio} = (E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{Ptarget}}(\text{control-sample})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{Pref}}(\text{control-sample})}$, where the reference gene was tubulin

146 and the target genes were ENO1 (bradyzoite-specific) and ENO2 (tachyzoite-specific).

147 In order to determine myogenic differentiation of skeletal muscle cells in vitro, total RNA was

148 isolated from non-infected cells at 2 days until 10 days after seeding. Ten nanograms of cDNA

149 per sample were used as template for semi-quantitative PCR using the following primers: Myf5

150 forward: 5'-TGAGGGAACAGGTGGAGAAC-3'; Myf5 reverse: 5'-

151 AGCTGGACACGGAGCTTTTA-3'; MyoD1 forward: 5'-TACCCAAGGTGGAGATCCTG-3';

152 MyoD1 reverse: 5'-CATCATGCCATCAGAGCAGT-3'; β -actin forward 5'-

153 GATGACCCAGATCATGTTTGAGAC-3'; β -actin reverse: 5'-

154 TGCTCGAAGTCTAGAGCAACATAG-3'. PCR products were separated in 1% agarose and

155 visualized using ethidium bromide.

156

157 Statistical analysis

158 Results are expressed as means \pm S.E.M. of at least three independent experiments unless
159 otherwise indicated. Significant differences between mean values were identified by Student's *t*-
160 test. In order to avoid false positive results due to multiple comparisons, *P*-values were
161 multiplied with the number of comparisons (Bonferroni correction). Corrected *P* values of less
162 than 0.05 were considered significant.

163

164

165 Results and discussion

166 In order to determine the suitability of primary embryonic skeletal muscle cells for investigating
167 the development and stage conversion of *T. gondii* in muscular tissue, we characterized
168 myogenic differentiation after cultivation of satellite cells from thigh muscles in medium
169 containing 15% horse serum and 2% fetal calf serum. Phase contrast microscopy revealed fusion
170 of myocytes and formation of mature myotubes starting at 4 until 5 days after seeding with
171 considerable numbers of highly elongated myotubes being present at 6 days after seeding (Fig.
172 1A). Sustained myogenic differentiation was confirmed by the presence of multiple mature
173 myotubes with 10-20 nuclei per syncytium expressing the basic helix-loop-helix transcription
174 factor MyoD (Fig. 1C). In addition, regular contractions of such myotubes were observed and
175 recorded by time-lapse video microscopy (data not shown). The kinetics of the expression of
176 specific genes that play pivotal roles in the differentiation and commitment of myoblasts to
177 myotubes revealed that *Myf5* was expressed as early as 2 days after seeding until the end of the
178 observation period (Fig. 1B). In contrast, the expression of MyoD was up-regulated at 4-6 days
179 thus acting downstream of *Myf5* during myogenesis (Tajbakhsh et al., 1997). Together, these
180 data indicated that in vitro differentiated primary skeletal muscle cells represented a valuable
181 model to study the interaction of *T. gondii* with mature myotubes.

182 The infection of skeletal muscle cells with *T. gondii* tachyzoites, i.e. fast-replicating
183 disseminating parasites which are present during acute toxoplasmosis and their subsequent
184 intracellular development and differentiation was followed from 4 hours until 6 days after
185 infection. Immunofluorescence staining and confocal laser scanning microscopy revealed that *T.*
186 *gondii* readily infected skeletal muscle cells as judged by intracellular parasites at 4 hours and
187 subsequent replication (Fig. 2A). A productive infection of murine skeletal muscle cells by *T.*
188 *gondii* tachyzoites was expected due to the active invasion of virtually any mammalian cell type
189 (Dobrowolski and Sibley, 1996). At this early time point following infection, parasites did not
190 react with monoclonal antibody CC2 that specifically label bradyzoite PVs but not tachyzoite
191 PVs (Gross et al., 1995; Ferguson, 2004). Instead, they were strongly positive after
192 counterstaining with polyclonal anti-*Toxoplasma* serum (Fig. 2A; a-c). At 24 hours after
193 infection, multiple *Toxoplasma* vacuoles had already become CC2-reactive (Fig. 2A; d), thereby,
194 indicating onset of conversion to the bradyzoite stage. This is remarkable, since tachyzoites in
195 skeletal muscle cells converted spontaneously to bradyzoites, i.e. in the absence of exogenous
196 stress factors. To date, the development of *T. gondii* bradyzoites has been mainly recognized as a
197 stress-mediated differentiation that leads to metabolic and morphological adaptations of the
198 parasite. This view is indeed sustained by results from various studies showing that stage
199 conversion can be induced in vitro by applying temperature or pH stress (Soète et al., 1994),
200 proinflammatory cytokines or mitochondrial inhibitors (Bohne et al., 1994), or nutrient stress
201 (Fox et al., 2004). Furthermore, bradyzoite development in vivo has been predominantly
202 recognized 2 to 3 weeks after infection, i.e. after induction of a robust anti-*Toxoplasma*
203 immunity (Ferguson and Hutchinson, 1987). However, in primary skeletal muscle cells which
204 had been differentiated to mature myotubes, *T. gondii* tachyzoite-to-bradyzoite differentiation
205 occurred independently of an exogenous stress stimulus. This clearly showed that stage
206 conversion can be triggered by other factors than cellular stress. We also noted that PVs adjacent
207 to bradyzoite-containing vacuoles remained partially non-reactive with mAb CC2 (Fig. 2A; f).

208 Stage conversion of *T. gondii* within skeletal muscle cells was thus a non-synchronized process
209 as previously reported for other host cell types (Bohne et al., 1993; Soète et al., 1993). This
210 further argued against cellular stress encountered by *T. gondii* as a major prerequisite for stage
211 conversion in skeletal muscle cells since the environment for different parasites within a single
212 cell is assumed to be similar. Two days after infection, parasite division had proceeded and
213 vacuoles containing four to sixteen parasites were detected within skeletal muscle cells. From
214 this time point onwards, the reactivity of the CC2 antibody with the matrix of multiple
215 bradyzoite-containing PVs rather than the parasite itself also became apparent (Fig. 2A; g,i). The
216 CC2-reactivity of an increasing number of vacuoles further increased subsequently (Fig. 2A;
217 j,m). In addition, a predominant immunolabelling of material destined for and incorporated into
218 the cyst wall was also clearly visible until 6 days after infection (Fig. 2A; j,m). Using
219 immunofluorescence and immunoelectron microscopy, the CC2 antibody was previously shown
220 to preferentially label the wall of tissue cysts from chronically infected mouse brains, i.e. a
221 characteristic structure of mature *Toxoplasma* tissue cysts (Gross et al., 1995; Ferguson, 2004).
222 Although a definitive antigenic marker for mature tissue cysts is still lacking (Tomavo and
223 Weiss, 2007) the predominant CC2-labelling of a cyst wall-like structure at 6 days after infection
224 (Fig. 2A; m) argued for considerable maturation of the bradyzoite PVs in primary skeletal
225 muscle cells. Recently, we demonstrated ultrastructurally that the cystogenesis of *T. gondii* in
226 skeletal muscle cells is completed within 96 hours after infection with bradyzoites (Guimaraes et
227 al., 2008). These cells thus obviously provide a suitable cellular environment that sustains
228 development of bradyzoites and – at least to a certain extent – tissue cyst maturation without the
229 need of an exogenous stress stimulus.

230 Most importantly, quantification of the *Toxoplasma* PVs in skeletal muscle cells revealed a
231 prominent increase of the percentages of CC2-reactive, i.e. bradyzoite-containing vacuoles
232 within the first day of infection (23.8 ± 3.4 ; Fig. 2B). The increase at this early time point
233 following infection excluded the possibility that it resulted from a loss of CC2-negative vacuoles

234 due to host cell lysis by rapidly dividing tachyzoites rather than enhanced numbers of
235 bradyzoite-containing vacuoles. Tachyzoites of the *T. gondii* NTE strain that we used herein
236 require 48-60 hours before host cell lysis occurs to a significant extent. Likewise, host cell lysis
237 leading to significant numbers of extracellular parasites was not observed until 4 days after
238 infection of skeletal muscle cells (data not shown). The conversion of *T. gondii* to the bradyzoite
239 stage steadily increased during prolonged intracellular infection with $46 \pm 3.5\%$ of the vacuoles
240 being CC2-reactive at 6 days (Fig. 2B). We also observed high rates of *T. gondii* transition to the
241 bradyzoite stage after tachyzoite infection of L6.C10 rat myoblast cells that were differentiated
242 to mature myotubes (data not shown). In order to determine cell-type specific differences in the
243 conversion of *T. gondii* to the bradyzoite stage, L929 murine fibroblasts were infected with
244 tachyzoites of the NTE strain in parallel and stage conversion assessed as described above. The
245 results showed that the percentages of CC2-reactive vacuoles were significantly lower in murine
246 fibroblasts as compared to skeletal muscle cells ($P < 0.01$; Student's *t*-test) and did not exceed
247 20% (Fig. 2B). This strongly supported the view that the host cell type critically impacts the
248 differentiation of *T. gondii* to a dormant life stage.

249 In order to further support the finding that *T. gondii* readily converts to the bradyzoite stage
250 within skeletal muscle cells at the molecular level, transcripts of the stage-specifically expressed
251 genes ENO1 and ENO2 (Dzierszynski et al., 2001) were quantified by real-time RT-PCR.
252 Expression of both genes was calculated relative to the expression of the house-keeping gene *T.*
253 *gondii* tubulin in order to take into account the increase of mRNA due to replication of the
254 parasite over time and differences in the isolation of mRNA among individual samples. The
255 relative expression of the tachyzoite-specific gene ENO2 did not change significantly from 1 to 6
256 days after infection of primary skeletal muscle cells as compared to the transcript level at 4 hours
257 (Fig. 2C). In contrast, the relative levels of *T. gondii* ENO1 transcripts continuously increased
258 from 4 hours after infection until the end of observation with the most prominent increases being
259 observed at 4 and 6 days following infection (Fig. 2C). These results clearly confirmed the view

260 of a high level of spontaneous conversion of *T. gondii* tachyzoites to bradyzoites in skeletal
261 muscle cells.

262 Tissue cysts of *T. gondii* are preferentially found in the central nervous system including the
263 retina and in striated muscles of infected animals (Dubey et al., 1998). Such tissue tropism may
264 partially result from reduced or inadequate anti-parasitic immune responses in these organs. Cyst
265 numbers in the brains of mice differ depending on the MHC genetic background (Brown and
266 McLeod, 1990), indeed confirming a role for immune-mediated mechanisms in the regulation of
267 tissue cyst development within the brain. However, here we have shown for the first time that
268 initial prerequisites of parasite persistence, i.e. invasion of suitable host cells by *T. gondii*
269 tachyzoites and their transition to bradyzoites readily occur in primary skeletal muscle cells.

270 Importantly, such stage conversion in skeletal muscle cells occurred independently of exogenous
271 stress factors and was clearly more efficient than in fibroblasts indicating that it is critically
272 influenced by cell type-specific factors. Recently, Radke et al. (2006) demonstrated a critical role
273 of the human cell division autoantigen-1 (CDA-1) in bradyzoite development in human
274 fibroblasts. In those cells, parasite differentiation depended on trisubstituted pyrrole-triggered de
275 novo host cell transcription of CDA-1, i.e. a drug-induced cellular environment that sustains
276 bradyzoite formation (Radke et al., 2006). It is thus tempting to speculate that spontaneous stage
277 conversion in skeletal muscle cells depends on a constitutive expression of CDA-1, or on one of
278 the other genes encoding growth regulators of mammalian cells, the expression of which
279 correlated with bradyzoite formation (Radke et al., 2006). Since myotubes as employed herein
280 are withdrawn from cell cycle progression (Sabourin and Rudnicki, 2000), negative regulators of
281 the host cell cycle as CDA-1 (Chai et al., 2001; Tu et al., 2007) are indeed possible candidates
282 which could provide an adequate signal for the commitment of *T. gondii* to bradyzoite
283 development in skeletal muscle cells. Whether and to what extent the specific immunological
284 environment of striated muscle (Wiendl et al., 2005) regulates long-term persistence of *T. gondii*
285 cysts in vivo awaits future clarification.

286 In conclusion, skeletal muscle cells provide a host niche that readily triggers bradyzoite
287 development without the need of exogenous stress stimuli. We hypothesize that this at least
288 partially explains the preferential persistence of *T. gondii* in muscle tissues in vivo. It may,
289 thereby, provide the molecular basis for one of the major routes of transmission of an important
290 zoonotic parasite to humans, i.e. ingestion of raw or undercooked tissue cyst-containing meat
291 products from infected livestock.

292

293

294 **Acknowledgements**

295 We are grateful to W. Bohne, Göttingen for helpful discussion. This work received financial
296 support from the Bundesministerium für Bildung und Forschung (TOXONET01, grant 01 KI
297 0766 to C.G.K. Lüder). The support of M.F. Ferreira-da-Silva by the Deutscher Akademischer
298 Austauschdienst (DAAD)/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior
299 (CAPES), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the
300 Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) and the Katholischer Akademischer Ausländerdienst
301 (KAAD) is gratefully acknowledged.

302

303

304 **References**

- 305 Barbosa, H.S., Pereira, M.C.S., Meirelles M.N.L., 2000. Protocolos de culturas primárias. In:
306 Araújo-Jorge, T., de Castro, S.L., Doença de Chagas (Eds.), *Manual para experimentação*
307 *animal*. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 297-313.
- 308 Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U., 1993. Coexistence of heterogeneous populations of
309 *Toxoplasma gondii* parasites within parasitophorous vacuoles of murine macrophages as
310 revealed by a bradyzoite-specific monoclonal antibody. *Parasitol. Res.* 79, 485-487.

- 311 Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U., 1994. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is
312 necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in
313 triggering stage conversion. *Infect. Immun.* 62, 1761-1767.
- 314 Brown, C.R., McLeod, R., 1990. Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in
315 *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 145, 3438-3441.
- 316 Chai, Z., Sarcevic, B., Mawson, A., Toh, B.-H., 2001. SET-related cell division autoantigen-1
317 (CDA1) arrests cell growth. *J. Biol. Chem.* 276, 33665-33674.
- 318 Dobrowolski, J.M., Sibley, L.D., 1996. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by
319 the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* 84, 933-939.
- 320 Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A., 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites,
321 bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol.*
322 *Rev.* 11, 267-299.
- 323 Dzierszynski, F., Mortuaire, M., Dendouga, N., Popescu, O., Tomavo, S., 2001. Differential
324 expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during
325 stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Mol. Biol.* 309, 1017-1027.
- 326 Ferguson, D.J.P., Hutchinson, W.M., 1987. An ultrastructural study of the early development
327 and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol. Res.* 73, 723-
328 734.
- 329 Ferguson, D.J.P., 2004. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage
330 conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int. J.*
331 *Parasitol.* 34, 347-360.
- 332 Fox, B.A., Gigley, J. P., Bzik, D.J., 2004. *Toxoplasma gondii* lacks the enzyme required for de
333 novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int. J. Parasitol.*
334 34, 323-331.

- 335 Gross U., Bormuth H., Gaissmaier C., Dittrich C., Krenn V., Bohne W., Ferguson D.J., 1995.
336 Monoclonal rat antibodies directed against *Toxoplasma gondii* suitable for studying
337 tachyzoite-bradyzoite interconversion in vivo. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 542-548.
- 338 Guimarães, E.V., Carvalho, L., Barbosa, H.S., 2008. Primary culture of skeletal muscle cells as a
339 model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis. *J. Parasitol.* 94, 72-83.
- 340 Montoya, J.G., Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965-1976.
- 341 Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software toll (REST®) for
342 group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time
343 PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36.
- 344 Radke, J.R., Donald, R.G., Eibs, A., Jerome, M.E., Behnke, M.S., Liberator, P., White, M.W.,
345 2006. Changes in the expression of human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma*
346 *gondii* growth and development. *PLOS Pathog.* 2, e105.
- 347 Sabourin, L.A., Rudnicki, M.A., 2000. The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Genet.* 57,
348 16-25.
- 349 Soète, M., Fortier, B., Camus, D., Dubremetz, J.F., 1993. *Toxoplasma gondii*: Kinetics of
350 bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 76, 259-264.
- 351 Soète, M., Camus, D., Dubremetz, J.F., 1994. Experimental induction of bradyzoite-specific
352 antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii in vitro*. *Exp*
353 *Parasitol.* 78, 361-370.
- 354 Streilein, J.W., 1995. Unraveling immune privilege. *Science* 270, 1158-1159.
- 355 Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., Cossu, G., Buckingham, M., 1997. Redefining the genetic
356 hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell*
357 89, 127-138.
- 358 Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans.
359 *Int. J. Parasitol.* 30, 1217-1258.

360 Tomavo, S., Weiss, L.M., 2007. *Toxoplasma* gene regulation and bradyzoite development. In:
361 Ajioka, J.W., Soldati, D. (Eds.), *Toxoplasma*. Molecular and cellular biology. Horizon
362 Bioscience, Norfolk, pp. 285-301.

363 Tu, Y., Wu, W., Wu, T., Cao, Z., Wilkins, R., Toh, B.-H., Cooper, M.E., Chai, Z., 2007.
364 Antiproliferative autoantigen CDA1 transcriptionally up-regulates p21^{Waf/Cip1} by activating
365 p53 and MEK/ERK1/2 MAPK pathways. *J. Biol. Chem.* 282, 11722-11731.

366 Wiendl, H., Hohlfeld, R., Kieseier, B.C., 2005. Immunobiology of muscle: advances in
367 understanding an immunological microenvironment. *Trends Immunol.* 26, 373-380.

368

369

370 Legends to illustrations

371

372 **Fig. 1.** Characterization of murine primary skeletal muscle cells during myogenesis. Satellite
373 cells were isolated from thigh muscles of mouse embryos and were differentiated to mature
374 myotubes in vitro. (A) Phase contrast micrographs of multiplicative myoblasts at 2 days after
375 isolation (a) and multiple mature myotubes 4 days later (b; arrows). (B) Expression of Myf-5,
376 MyoD and β -actin transcripts during myogenesis in primary skeletal muscle cells from 2 to 10
377 days after isolation of the cells. Transcripts were reverse transcribed and cDNAs amplified by
378 PCR using specific primer pairs. Amplification of β -actin was used as an internal standard to
379 normalize the amounts of cDNAs among different samples, non-template controls were run in
380 parallel (nc). (C) Immunofluorescence staining of multinucleated skeletal muscle cells at 6 days
381 after isolation from mouse embryos. Cells were immunolabelled with anti-MyoD and Cy-3
382 conjugated secondary antibodies.

383

384 **Fig. 2.** Intracellular development and transition of *T. gondii* to bradyzoites in skeletal muscle
385 cells. Primary skeletal muscle cells from mouse embryos were differentiated in vitro for 4-5 days

386 and were then infected with *T. gondii* tachyzoites for 4 hours to 6 days as indicated. L929 murine
387 fibroblasts infected with *T. gondii* were used as control cells (B, open symbols). Parasites were
388 visualized by indirect double immunofluorescence staining with CC2 monoclonal antibody
389 recognizing bradyzoite-containing PVs (green fluorescence) and polyclonal anti-*Toxoplasma*
390 serum (red fluorescence). (A) Images of each labelling were simultaneously obtained by
391 confocal laser scanning microscopy and were superimposed (merge); micrographs are
392 representative for the parasite development as observed in three independent experiments. (B)
393 The percentages of CC2-reactive bradyzoite-containing PVs in primary skeletal muscle cells
394 (closed symbols) or fibroblasts (open symbols) were determined microscopically by counting at
395 least 100 parasitophorous vacuoles per sample. Bars represent means \pm S.E.M. from three
396 independent experiments; significant differences between stage conversion in both cell types
397 were identified by Student's *t*-test (** $P < 0.01$). (C) Alternatively, RNA was isolated from
398 skeletal muscle cells at different time points after infection or from uninfected controls, and
399 analysed by quantitative real-time RT-PCR using primers which specifically amplify tachyzoite-
400 specific ENO2, bradyzoite-specific ENO1, or constitutively expressed *Toxoplasma* tubulin. The
401 relative gene expression levels of ENO 1 and ENO2 were calculated as the fold change between
402 4 hours after infection and later time points with tubulin as an internal standard in order to
403 normalize the amount of cDNA present in each sample. Data are presented as log₂ ratios \pm
404 S.E.M. and derive from two independent experiments.

Figure 1

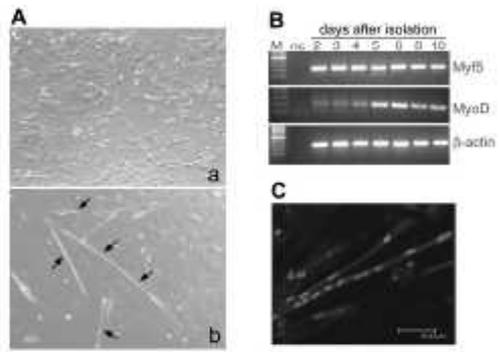
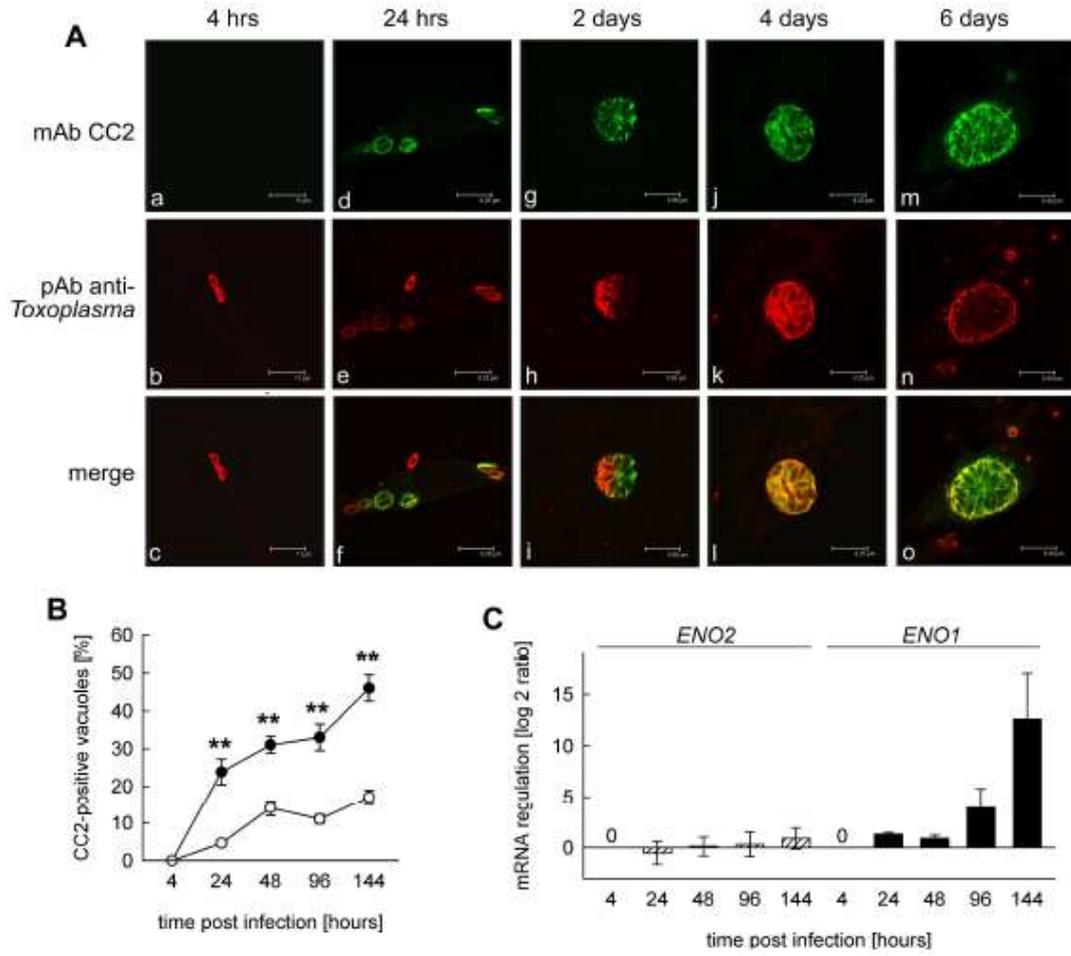


Figure 2



ANEXO II

1 **Q1** Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii* 1

5 Marialice da Fonseca Ferreira da Silva,^{ab} Helene S. Barbosa,^b Uwe Groß^a and Carsten G. K. Lüder^{ab} 5

Received 11th January 2008, Accepted 31st March 2008

First published as an Advance Article on the web

10 DOI: 10.1039/b800520f 10

Toxoplasma gondii is an obligatory intracellular parasitic protozoan that infects a variety of avian and mammalian hosts including up to one third of the human population worldwide. Developmental differentiation between distinct stages, *i.e.* sporozoites, tachyzoites and bradyzoites is fundamental for the parasite life cycle and for transmission between hosts. It is also interconnected with the pathogenesis of overt toxoplasmosis and makes *T. gondii* an important opportunistic pathogen of humans. In order to delineate the underlying mechanisms, several cell culture differentiation systems have been developed which mimic the transition from fast-replicating tachyzoites to slowly proliferating bradyzoites *in vitro*. Since exogenous stress factors, *i.e.* alkaline pH, IFN- γ and other proinflammatory cytokines, chemicals or drugs, heat shock, and deprivation of nutrients have been shown to increase the efficacy of bradyzoite development *in vitro*, *Toxoplasma* stage differentiation is largely viewed as a stress-related response to hostile environmental conditions. However, tachyzoite to bradyzoite differentiation also occurs spontaneously *in vitro* and this raises questions about the importance of stress conditions for triggering stage conversion. High frequencies of spontaneous bradyzoite development in primary and permanent skeletal muscle cells, *i.e.* cells that preferentially harbour bradyzoite-containing tissue cysts *in vivo* suggest that the host cell type may be critical. Furthermore, the host cell transcriptome, including the expression of distinct host cell genes, has recently been shown to trigger bradyzoite development and cyst formation. Together, these results strongly indicate that the complex cellular environment, besides exogenous stress factors, may govern the developmental differentiation of *T. gondii*. 30

Introduction

35 Developmental differentiation is a fundamental process in living organisms. It is essential in multicellular organisms and is common among prokaryotes and unicellular eukar-

yotes. Differentiation in single-celled organisms is a temporal phenomenon that is often associated with altered environmental conditions and involves the switching from one developmental stage to another. In the case of protozoan parasites, such differentiation is most frequently an obligatory process with distinct life cycle stages being required for sexual reproduction, for transmission between mammalian hosts and invertebrate vectors, or for survival within distinct niches of the host. ¹ Differentiation from one parasite stage to another is 40

^a Institute for Medical Microbiology, Georg-August-University, Kreyberggring 57, D-37075 Göttingen, Germany. E-mail: chuecker@gwdg.de; Fax: +49-551-395861; Tel: +49-551-395869

^b Laboratory of Structural Biology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil



45 Marialice da Fonseca Ferreira da Silva 50



50 Helene S. Barbosa 55



55 Uwe Groß



55 Carsten G. K. Lüder **Q2**

1 also a critical factor in the pathogenesis of several protozoan diseases.

Toxoplasma gondii is an obligatory intracellular parasite of avian and mammalian hosts including humans. It is considered to be one of the most ubiquitously distributed and widespread parasites with a seroprevalence in humans of up to 30% worldwide.² Fortunately, infection of immunocompetent hosts is mostly asymptomatic or benign, however *T. gondii* is an important opportunistic pathogen of immunocompromised patients, *i.e.* those with AIDS, and the fetuses of recently infected pregnant women.³

The life cycle of *T. gondii* involves the developmental switching between three infectious stages: tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites. Infection by *Toxoplasma* is typically acquired by the ingestion of undercooked meat from infected hosts which chronically harbor bradyzoite-containing tissue cysts, or through the accidental ingestion of sporozoite-containing oocysts which are shed into the environment with the feces of cats (the definitive host).^{2,4} In addition, following primary maternal infection during pregnancy, *T. gondii* tachyzoites can be vertically transmitted to fetuses by transplacental migration.^{2,4} Differentiation from the tachyzoite to the bradyzoite stage of *Toxoplasma* is crucial for the development of tissue cysts and, thus for the persistence of the parasite for long time in the host.^{5,6} Consequently, it is a main prerequisite for parasite transmission² as well as the pathogenesis of reactivated toxoplasmosis.³

Considering the importance of cystogenesis of *T. gondii* in the parasite life cycle and the pathogenesis of disease, there has been an intense focus on the development of methods to study tachyzoite-bradyzoite differentiation. Although the occurrence of bradyzoite-containing tissue cysts *in vitro* was reported more than 45 years ago,⁷ the molecular basis for the developmental switch and the precise factors that promote this important event are only recently beginning to emerge.^{1,5,8,9} The development of *in vitro* systems to study the inter-conversion of tachyzoites and bradyzoites has opened doors to analyze the precise mechanisms that regulate developmental differentiation in *T. gondii*. Optimized culture conditions have been applied in order to maximize bradyzoite differentiation and to analyze this phenomenon at the molecular level and for extended periods of time *in vitro*.¹

This review will focus on the *Toxoplasma* tachyzoite-bradyzoite differentiation and promote a discussion on the impact of exogenous stress conditions in different cell types to induce stage conversion *in vitro*. We will also raise the question of whether spontaneous stage conversion in certain cell types, *e.g.* skeletal muscle cells or neurons might contribute to the development of *Toxoplasma* tissue cysts to a considerable extent, thereby promoting transmission of an important zoonotic parasite to humans *via* raw or undercooked meat from infected livestock and to other hosts.

55 Stage conversion of *T. Gondii* *in vitro* and *in vivo*

After ingestion by intermediate hosts, *e.g.* humans or livestock animals, bradyzoites or sporozoites rapidly differentiate into tachyzoites, *i.e.* fast multiplying parasites which disseminate within the host and lead to the acute phase of infection.^{2,4} In

immunocompetent hosts, the innate and ensuing adaptive cell-mediated immune responses are capable of controlling the tachyzoite stage. However, the parasite is not completely eliminated and tachyzoites partially differentiate into slowly replicating bradyzoites. Such stage conversion is accompanied by the reorganization of the parasitophorous vacuole into tissue cysts which may contain hundreds of individual parasites and persist for extended periods of time in distinctive tissues in immunocompetent hosts. They are particularly prevalent in neural and muscular tissue and characterize the chronic phase of infection. Since bradyzoites—during experimental toxoplasmosis in mice or other laboratory animals—are first recognized after the onset of an efficient anti-parasitic immunity, it has been proposed that the stress exerted by the host's immune response may trigger the transition from the tachyzoite to the bradyzoite stage.¹⁰ This view is supported by the fact that during latent infection, bradyzoites can reconvert to replicative tachyzoites in severely immunocompromised hosts, eventually giving rise to necrotizing lesions and life-threatening reactivated toxoplasmosis.³ This might indicate that anti-parasitic immunity at least stabilizes the latent form of the parasite in immunocompetent hosts. Whether it is also the main trigger for the transition of tachyzoites to bradyzoites, however, is not yet known. It is agreed that bradyzoite-containing tissue cysts are not static structures, instead they regularly break down and rupture host cells with a few parasites reinvading new host cells.^{11,12}

Studies *in vitro* have shown that immunological factors are not necessarily required for cyst formation. Several *in vitro* models have indeed been developed and may thus be suitable to study the molecular mechanisms of the interconversion of tachyzoites to bradyzoites in the absence of a complex host's response.^{13–24} Furthermore, *in vitro*-developed tissue cysts ultrastructurally resembled those which formed *in vivo* after the infection of mice.²⁵ However, *T. gondii* stage conversion is a heterogeneous process leading to mixed parasite populations comprised of both tachyzoites and bradyzoites.^{19,26} In order to increase the efficacy of parasite transition to the bradyzoite stage, the application of several stress conditions started 15 years ago when it was observed that parasites expressing bradyzoite proteins were more abundant in cell cultures grown under deleterious conditions. Based on that experience, the effect of different culture conditions on the differentiation of *T. gondii* has been investigated applying mainly five different stress factors: alkaline pH; IFN- γ and other pro-inflammatory cytokines or agents; high temperature; chemicals or drugs; and the depletion of nutrients. These have helped to define molecular prerequisites for *Toxoplasma* stage conversion and may open new avenues towards the development of novel approaches to ultimately defeat the infection.⁸

Stress conditions to induce bradyzoite development

Alkaline pH—the 'shift medium'

The induction of conversion from the tachyzoite to the bradyzoite stage by increasing the pH of the culture medium to pH 8.0–8.2 is the most common strategy to study *Toxoplasma* differentiation *in vitro* (Table 1).^{21,27,28} Bradyzoite

1 Table 1 Stress-induced bradyzoite formation and cyst development of *T. gondii*

Stress condition	Host cell	<i>Toxoplasma</i> strain	Induction of bradyzoites/ cysts	Ref.
5 Alkaline pH (pH 8.0–8.2)				
Continuous exposure of infected cells	Vero cells (African Green Monkey kidney cells), HFF (human foreskin fibroblasts), human fibroblast cell line	RH, ME49, VEG, 'exotic' strains COUG, CAST, GPHT	Bradyzoites, cyst-like vacuoles	9, 21, 27–29, 31, 33
Preexposure of parasite	HFF Human fibroblast cell line	'Exotic' strains MAS, FOU ME49	Weak induction Bradyzoites, cyst-like vacuoles	29 30
10 <i>IFN-γ</i>	Murine MΦ HFF Murine astrocytes	NTE RH, VEG, ME49 PE	Bradyzoites No induction No induction, but stabilization of cysts	20, 26 27, 28, 39 14
<i>Proinflammatory agents</i>	Rat neurons, astrocytes, microglia	NTE	No induction	38
15 IL-6	Human fibroblast cell line	ME49	Bradyzoites, cyst-like vacuoles	27
LPS	Murine MΦ	NTE	Bradyzoites	20
Sodium nitroprusside (NO)	Murine MΦ Rat CNS cells	NTE NTE	Bradyzoites Bradyzoites	20 38
	HFF, human fibroblast cell line	ME49, PLK	Bradyzoites	30, 40
20 <i>Therapeutics</i>				
atovaquone	Murine MΦ, Vero cells	NTE, PLK	Bradyzoites	41, 42
pyrimethamine	Murine MΦ	NTE	Bradyzoites	42
sulfadiazine	Murine MΦ Vero cells	NTE PLK	Bradyzoites No induction	42 41
Sodium arsenite	Vero cells, HFF	RH	Bradyzoites, no cyst-like vacuoles	28
25 <i>Mitochondrial inhibitors</i>				
oligomycin, antimycin	Murine MΦ	NTE	Bradyzoites	20
roxythiazol, rotenone	Vero cells	PLK	Bradyzoites	41
30 <i>Trisubstituted pyrrole (Compound 1)</i>	HFF	ME49, VEG	High levels of bradyzoites and cyst-like structures	39, 45
<i>Heat shock (43 °C)</i>	Vero cells	RH, GT-1 RH	Much weaker induction Bradyzoites, cyst-like vacuoles	39 28
<i>Deprivation of nutrients</i>				
Arginine starvation	HFF	RH, PLK/ME49	Bradyzoites, cyst-like vacuoles	54
35 Pyrimidine starvation	HFF	RHaupt, Prugnaud	Bradyzoites, cyst-like vacuoles	1, 55
Temporary axenic culture	HFF	PLK, 76K	Bradyzoites, cyst-like vacuoles	56
Cyclic nucleotide signaling	HFF	PLK, ME49	Bradyzoites	57, 58

45 differentiation appears to be more frequent and consistent under alkaline culture conditions than after treatment with pro-inflammatory cytokines.^{27,28} Moreover, parasites shifted towards the bradyzoite stage using alkaline pH represent the most defined bradyzoite phenotype that can be achieved in tissue culture.⁹ It has to be stressed, however, that alkaline pH does not represent a physiological stress condition that mimics the triggering of stage conversion *in vivo*.

50 The strategy that is mostly applied is to infect the host cells with *T. gondii* under physiological pH (pH 7.2–7.4) for several hours in order to allow host cell invasion by the parasite. After that time, the parasite-infected cell culture is maintained in an alkaline medium previously adjusted to pH 8.0–8.2 using KOH. *T. gondii*-infected cells in 'shift medium' are generally cultured in an atmosphere without exogenous CO₂ in order to avoid pH variation and to maintain the alkaline condition

45 over the experimental period.²⁸ Unfortunately, alkaline pH has often not permitted analysis of *Toxoplasma* bradyzoite development for extended periods of time because host cells are severely injured by the culture conditions. It has been nevertheless proven to be highly effective in inducing cyst development in the *Toxoplasma* mouse-virulent RH strain (Table 1).²⁸ Likewise, 3 to 4 days after infection of human 50 fibroblasts with the mouse-avirulent ME49 strain and maintenance at alkaline pH, development of thick-walled, electron lucent vacuoles became apparent, thus, resembling *Toxoplasma* tissue cysts (Table 1).²⁷ Such cyst-like vacuoles often contained odd numbers of parasites, indicating asynchronous parasite replication. Importantly, expression of the bradyzoite-specific protein BAG-1 was apparent using western blotting and further increased from day 3 to day 6.²⁷ The results were corroborated by immunofluorescence microscopy 55

1 demonstrating that the parasites expressed BAG-1 but not
SAG-1, thus, confirming that bradyzoite-specific but not
tachyzoite-specific antigens were expressed.²⁷ Bradyzoite forma-
2 tion and cyst development induced by alkaline pH was
5 recently extended to other *Toxoplasma* strains. Interestingly,
defects in the oral transmission of some 'exotic' parasite
strains correlated with an impaired capacity to differentiate
from tachyzoite to bradyzoites and to form cyst-like structures
(Table 1), thereby, highlighting the importance of stage con-
10 version for parasite transmission to new hosts.²⁹

Interestingly, bradyzoite development can also be induced
by exposure of extracellular tachyzoites to alkaline pH for
only one hour prior to infection of the host cells and cultiva-
tion at physiological pH (Table 1).³⁰ This avoids injury of the
15 host cells by the deleterious effect of high pH and may allow
the follow-up of stage conversion and cyst formation for
extended periods of time. Most importantly, it suggests that
commitment of *T. gondii* to differentiate to the bradyzoite
stage can occur rapidly and as a direct response of the parasite
20 to stressful conditions. It has to be mentioned, however, that
the rate of stage conversion after the short exposure of
extracellular parasites to alkaline pH was considerably lower³⁰
than that after continued cultivation of parasite-infected host
cells at high pH,²⁸ although a direct comparison of this issue
25 has not been undertaken. Therefore, a combination of both a
direct response of *T. gondii* to harmful conditions and an
indirect parasite response to host cell changes induced by
stress might trigger stage conversion.

T. gondii bradyzoites induced *in vitro* in human fibroblasts
30 using alkaline pH were also used to construct cDNA libraries
and to analyse this developmental stage genetically.^{9,31} Compar-
ison of expressed sequence tag (EST) frequencies or serial
analysis of gene expression (SAGE) tags from both tachyzoite-
and bradyzoite-derived libraries identified many stage-specifi-
35 cally expressed genes and was thereby indispensable in the
further characterization of the developmental differentiation
of *T. gondii*.^{9,31,32}

Recently, alkaline pH was used to identify autofluorescence
as a novel characteristic of *T. gondii* bradyzoites and cysts
40 after excitation with UV light of 330–385 nm.³³ This finding
could be useful for the rapid detection and quantification of
T. gondii cysts in complex samples or to increase our knowledge
on the structural features of tissue cysts.³³ Whether it also
applies to tissue cysts that have been generated *in vitro* by
45 other means than alkaline pH or that have developed *in vivo*
remains to be elucidated.

Interferon- γ and other proinflammatory cytokines—approaches 50 to mimic the immune system

In vivo, IFN- γ is absolutely required for resistance against *T.*
gondii.³⁴ In concert with other proinflammatory cytokines it
induces several effector mechanisms including the oxidative
burst, production of nitric oxide (NO) by the inducible nitric
55 oxide synthase (iNOS), tryptophan starvation, expression of
p47 GTPases and others which may limit parasite replication
or even kill *T. gondii*.³⁵ *In vitro* models of the tachyzoite-brady-
zoite differentiation that employ the anti-parasitic effect of
proinflammatory cytokines have the intention of partially

mimicking the stress for the parasite exerted by the host's
1 immune response.⁸ The role of IFN- γ in *in vitro* cultured cells
infected with *T. gondii* has been investigated for more than 20
years.^{14,26,36,37} IFN- γ has consistently been shown to limit
5 parasite replication *in vitro*^{20,26–28,36} whereas its impact on
stage conversion is less clear. Discrepancies in the effect on
triggering stage conversion may be largely related to the usage
of different cell types, parasite strains or host species. In IFN- γ
treated mouse macrophages, the expression of bradyzoite-
10 specific proteins was efficiently triggered (Table 1).^{20,26} How-
ever, in *T. gondii*-infected murine astrocytes or rat neural cells
cultured in the presence of IFN- γ , bradyzoite differentiation
and cyst formation was not enhanced (Table 1).^{14,38} Likewise,
IFN- γ was also inefficient in inducing stage conversion of the
15 virulent *Toxoplasma* RH strain or the avirulent VEG strain in
HFF cells (Table 1).^{23,39} Together, these studies imply that
IFN- γ is only effective in inducing stage conversion in certain
cell types and/or host species, but that it is required to limit
parasite replication, to prevent excessive host cell lysis and
20 thereby, to permit bradyzoite differentiation and cyst devel-
opment.^{14,27,28}

Analyses of the role of IFN- γ on bradyzoite differentiation
in *Toxoplasma*-infected murine macrophages identified nitric
oxide (NO) as a putative trigger.²⁰ Consequently, the NO
donor sodium nitroprusside (SNP) also induced bradyzoite
25 formation in murine macrophages, rat brain cells and human
fibroblasts (Table 1).^{20,30,33,40} However, since NO acts on
enzymes of the respiratory chain containing iron-sulfur centers,
this effect may be rather indirect, acting on the parasite
and possibly also the host cell mitochondrial electron trans-
30 port.^{20,41} It should be noted that finding NO as a trigger of
stage conversion might explain the differences in the induction
of bradyzoites by IFN- γ between host species and/or cell types
since the role of NO, for example in human cells, is contro-
35 versial.

IFN- γ was also correlated to the re-conversion of brady-
zoites to tachyzoites *in vitro*. Bradyzoite to tachyzoite differ-
entiation is particularly relevant during the pathogenesis of
overt and life-threatening toxoplasmosis in chronically in-
40 fected individuals upon immunosuppression, which often
leads to *Toxoplasma* encephalitis. This reactivation of latent
infection has not been extensively studied *in vitro*, but it is
generally assumed that abrogating the stress usually leads to a
rapid resumption of parasite multiplication, repression of
bradyzoite-specific genes and expression of tachyzoite-specific
45 ones.⁴² Jones *et al.* established long-term *in vitro* murine
astrocyte cultures which had been infected with brain-derived
Toxoplasma cysts.¹⁴ Treatment of these cultures with IFN- γ
starting from 40 days after infection (p.i.) limited parasite
replication but did not promote cyst development (see above).
50 Importantly, however, when IFN- γ was removed at 120 days
p.i. cyst rupture with many surrounding tachyzoites became
apparent within one week and after an additional two weeks
the astrocyte cultures were heavily infected with parasites of
different stages, but with a predominance of tachyzoites.¹⁴
55 These observations suggested that re-conversion of
Toxoplasma bradyzoites to tachyzoites could be prevented *in*
vitro when IFN- γ was present in the medium. It can be
hypothesized that IFN- γ stabilizes *Toxoplasma* cysts by

1 promoting the toxoplasmatatic activity of astrocytes, thereby
keeping mature bradyzoites in a G₀ arrested cell cycle stage.⁴³
Upon removal of IFN- γ by contrast, cell cycle re-entry and
recrudescence of an ongoing tachyzoite cell cycle may occur.⁴³
5 Beside IFN- γ , the effect of other proinflammatory cytokines
on *Toxoplasma* bradyzoite differentiation has been deter-
mined. Interleukin (IL)-6 which is produced by various lymphoid
and non-lymphoid cell types during inflammatory responses,
and which induces an acute phase response, increased the number
of *Toxoplasma* cysts that formed *in vitro* in human fibroblasts
(Table 1).²⁷ Remarkably, no synergism of IFN- γ and IL-6 in
bradyzoite formation was recognized in human fibroblasts,
again supporting the view that IFN- γ is ineffective in inducing
stage conversion in these cells.²⁷ In contrast, in murine
macrophages lipopolysaccharide (LPS)-induced tumor necrosis
factor (TNF)- α secretion, together with low concentrations of
IFN- γ , synergistically induced the transition of tachyzoites to
bradyzoites (Table 1).²⁹ Maximal activation of the macrophages
by high levels of both IFN- γ and LPS again abrogated
bradyzoite development, since parasite replication was completely
abolished.²⁹ It therefore appears that sub-maximal activation
of murine macrophages is required to allow a low level of
parasite replication, or at least cell cycle progression to reach
a premitotic cell cycle checkpoint that permits entry into a
modified bradyzoite differentiation pathway.⁴³ In contrast,
complete inhibition of parasite replication may prevent the
parasite reaching a physiological state that is appropriate for
starting stage conversion.

Drugs and chemicals

Most of the studies that have analysed the activity of anti-
microbial agents on *Toxoplasma* *in vitro* are restricted to the
effect on parasite replication rather than on stage conversion.
Usage of different *Toxoplasma* strains, different host cell types
as well as different methods for determining the rate of multi-
plication and bradyzoite differentiation hamper direct compar-
isons. The chemotherapeutics that are most widely used are
pyrimethamine, sulfadiazine, clindamycin, spiramycin, hydro-
xynaphthoquinones and new macrolides.⁴² The combination
of pyrimethamine and sulfadiazine is routinely used for the
therapy of human toxoplasmosis and has been shown to be
most effective in the reduction of tachyzoite replication *in vivo*
and *in vitro*. At the same time, however, pyrimethamine and
partially sulfadiazine also induce the expression of bradyzoite-
specific antigens (Table 1).^{41,42} Likewise, the hydroxynaphtho-
quinone atovaquone, which appears to have both anti-tachy-
zoite and anti-bradyzoite activity⁴⁴ also significantly reduced
Toxoplasma replication but was even more effective in indu-
cing conversion towards the bradyzoite stage than pyrimetha-
mine and sulfadiazine (Table 1).^{41,42} Thus, chemotherapeutics
that decrease *Toxoplasma* replication and avoid overt clinical
disease in infected patients may at the same time promote
stage conversion and persistence of the parasite.

In addition to studying the impact of anti-*Toxoplasma* drugs
on stage conversion from a pharmacological point of view,
several chemical compounds have been used to increase the
efficacy of stage conversion *in vitro* and to analyse the under-

lying mechanisms. Sodium arsenite was shown to efficiently
induce the expression of bradyzoite-specific antigens, but did
not induce cyst formation (Table 1).²⁸ This is remarkable since
it uncouples at least the initial events of bradyzoite differentia-
tion and cyst development, thus indicating that the formation
of mature *Toxoplasma* cysts is under control of more than one
checkpoint. Similarly, inhibitors of mitochondrial function,
i.e. oligomycin, antimycin A, rotenone, myxothiazol or the
chemotherapeutic agent atovaquone induced the expression of
bradyzoite-specific proteins although it is unclear whether these
parasites would build mature cysts (Table 1).^{29,41} As
already indicated above, these findings link the *in vitro*-induced
differentiation of *Toxoplasma* towards bradyzoites with
mitochondrial function under certain conditions. Whether this
also applies to the process as observed *in vivo* remains un-
known.

Recently, a trisubstituted pyrrole termed compound 1 was
shown to efficiently limit parasite replication, to induce
bradyzoite differentiation and to lead to cyst development *in vitro*
in human fibroblasts (Table 1).^{39,45} Remarkably, bradyzoite
development was shown to critically depend on the induced
expression of the cell division autoantigen-1 by the host cells.³⁹
This indicated for the first time that the drug-induced altera-
tion of transcription of a distinct host cell gene directly trigger
Toxoplasma differentiation (see below).

High temperature—the heat shock treatment

Another strategy to induce *Toxoplasma* stage conversion is to
apply high temperatures. This involves a pre-treatment of the
host cells for 2 h at 43 °C to allow the acquisition of thermo-
tolerance.^{46,47} After returning to 37 °C, cells are infected with
Toxoplasma tachyzoites for 2 h and then again heat-shocked at
43 °C for 12–48 h. Afterwards, the infected cells are main-
tained at 37 °C until the end of the experiment. This approach
effectively induced the development of bradyzoites (Table 1).²⁸
Prolonged heat treatment of the parasite-infected cells for up
to 48 h resulted in the largest number of cyst-like structures,
which resembled mature cysts, purified from the brain of
chronically infected mice.²⁸ This shows that heat treatment
appears appropriate to mimic the complete differentiation
from tachyzoites to cysts *in vitro*. Whether fever during acute
toxoplasmosis *in vivo* also promotes stage conversion has not
yet been determined. Importantly, heat shock induces the
differentiation process in both mouse-avirulent and mouse-
virulent *Toxoplasma* strains, although differentiation is gener-
ally more efficient in avirulent parasites.

As in prokaryotes and other eukaryotes, heat shock and
several other stress conditions are also associated in *T. gondii*
with the induction of heat shock proteins (HSP).^{30,48–51} Since
many of these agents are also linked with the transition of
tachyzoites to bradyzoites *in vitro*, the role of HSPs during
stage conversion of *Toxoplasma* has been further determined.
Surprisingly, expression of the small HSP-related bradyzoite-
specific HSP30/BAG-1 was dispensable for stage conversion
and tissue cyst development *in vitro* and *in vivo*.⁵² In contrast,
inhibition of *T. gondii* HSP72 (proposed to be a member of the
HSP70 family³⁰) and HSP90 using quercetin and/or geldana-
mycin, considerably suppressed tachyzoite to bradyzoite

1 transition *in vitro* suggesting a role in bradyzoite differentia- 1
tion.^{30,51} It has to be stressed however, that expression of 2
HSP70 transiently also increased during bradyzoite to tachy- 3
zoite differentiation *in vitro*.⁵³ Similarly, pharmacological in- 4
hibition of HSP90 not only impaired tachyzoite to bradyzoite 5
development but also that from bradyzoites to tachyzoites.⁵¹ 6
These results indicate that the role of HSP70 and HSP90 is not 7
restricted to stress-induced bradyzoite development but that 8
they rather generally regulate maintenance of protein structure 9
and function during developmental differentiation of *T. gondii*. 10

Nutrient stress—putting *Toxoplasma* on a diet

11 It is obvious that the rapidly proliferating tachyzoite form of 12
13 *Toxoplasma* has a higher need for nutrients than the slow-
replicating dormant bradyzoite stage. Recently, it has indeed
been shown that deprivation of the amino acid arginine
efficiently blocks parasite replication and triggers the differ-
entiation of tachyzoites into bradyzoites as well as the develop-
ment of cyst-like structures *in vitro* (Table 1).⁵⁴ *T. gondii*
lacks the enzymes required for *de novo* arginine biosynthesis
and thus relies on arginine uptake from the host cell.⁵⁴ Con-
sequently, formation of bradyzoite-containing cyst-like
structures by arginine starvation was highly efficient in both
mouse-virulent and mouse-avirulent *Toxoplasma* strains,
whereas the viability of parasites was not affected. The star-
ving of *T. gondii* in a related metabolic pathway, *i.e.* the
pyrimidine *de novo* biosynthesis and salvage pathway also
induces expression of bradyzoite-specific genes (Table 1). This
was convincingly demonstrated by culturing mouse-virulent
RH parasites that lack the uracil phosphoribosyltransferase
(*Uprt*) at ambient CO₂ concentration (0.03%).⁵⁵ *T. gondii* has
a fragmented pyrimidine salvage pathway that critically relies
on the *uprt* gene whereas CO₂ is required for *de novo* synthesis
of the pyrimidine ring. Simultaneous inhibition of the *de novo*
biosynthesis pathway and the salvage pathway, therefore,
efficiently abrogated uracil monophosphate (UMP) synthesis,
i.e. the precursor of all pyrimidines used by the parasite and
led to reduced parasite growth and transition towards the
bradyzoite stage.⁵⁵ Furthermore, even in wildtype parasites,
i.e. in the presence of the *uprt* gene, CO₂ starvation led to
bradyzoite differentiation and cyst-like vacuoles.¹ Inhibition
of the pyrimidine *de novo* biosynthesis pathway may be
sufficient to lower the available UMP pool to those levels that
trigger bradyzoite differentiation. It has to be stressed that the
levels of stage conversion induced by ambient CO₂ in wildtype
parasites clearly differ between strains with much higher levels
being observed in the mouse-avirulent Prugnaud strain¹ than
in the mouse-virulent RH strain.⁵⁵ Together, these studies
indicate that limited availability of distinct nutrients regulate
stage differentiation and is a valuable novel approach to
increase bradyzoite formation *in vitro* and to further our
knowledge on stage conversion of *Toxoplasma*.

14 As an obligatory intracellular parasite, temporary axenic 15
cultivation may—among other factors—also deprive *T. gondii*
tachyzoites of essential nutrients and growth factors. Twelve
hours in the absence of host cells indeed induced the expres-
sion of bradyzoite-specific genes and the formation of cyst-like
vacuoles after subsequent infection of HFF cells (Table 1).⁵⁶

16 Importantly, this finding again demonstrates that stress condi- 1
tions directly exerted on the parasite can trigger stage 2
conversion of *T. gondii* if the parasite is subsequently placed 3
into a suitable cellular environment. 4

Cyclic nucleotides—regulators of stress-related bradyzoite 5 formation?

6 In a variety of organisms, stress and differentiation responses 7
are associated with conserved cyclic nucleotide signalling 8
pathways. Similarly, permanently or transiently increasing 9
the levels of intracellular cGMP and cAMP, respectively, has 10
been shown to induce bradyzoite differentiation in *T. gondii*
(Table 1).⁵⁷ In addition, inhibitors of downstream cAMP- and 11
cGMP-dependent protein kinases led to tachyzoite-bradyzoite 12
transition (Table 1).⁵⁸ It is worthy to note that the NO donor 13
SNP, *i.e.* one of the stress-related triggers of stage conversion 14
(see above) also transiently increased intracellular cAMP 15
levels in both host cells and parasites.⁵⁷ Furthermore, eleva- 16
tion of the parasite cAMP level was critically associated with 17
the ability of *T. gondii* to differentiate to the bradyzoite stage 18
since it was only observed in the cyst-forming PLK strain but 19
not in the RH strain which has often a diminished capacity to 20
form bradyzoites.⁵⁷ These findings raise the interesting possi- 21
bility that cAMP and cGMP signalling are potentially 22
critical regulators of the stress-related differentiation process 23
in *T. gondii*. 24

Spontaneous stage conversion of *T. Gondii*

25 Analyses of *Toxoplasma* stage conversion under stress condi- 26
tions have doubtless broadened our understanding of a critical 27
event of the parasite life cycle and on the pathogenesis of 28
disease. The finding of various stress factors inducing stage 29
conversion and cyst development has put forward the view 30
that bradyzoite differentiation is a stress-related response of *T.* 31
gondii to hostile environmental conditions, such as the inflam- 32
matory response to the tachyzoite stage. Bradyzoite develop- 33
ment may indeed share features common to other stress- 34
induced differentiation processes such as the deprivation of 35
nutrients and endospore formation in bacilli, glucose starva- 36
tion and hyphae formation in fungi, or spore formation in 37
Dictyostelium discoideum.⁵ Being an obligatory intracellular 38
parasite that relies on persistence within its host, it appears 39
likely, however, that stage differentiation in *Toxoplasma* is 40
partially or predominantly regulated by other factors than 41
those observed in commensals or free-living organisms. Long- 42
standing observations as well as recent developments support 43
the view that bradyzoite formation might be physiologically 44
regulated by other factors than stress. 45

Spontaneous bradyzoite development

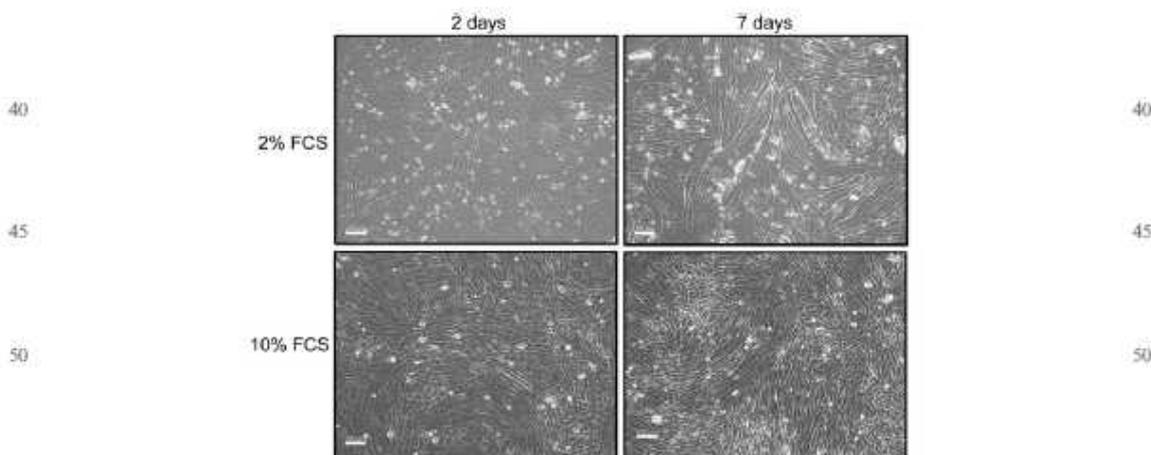
46 Bradyzoites and cyst-like structures can develop in cell cul- 47
tures in the absence of exogenous immune regulators, *i.e.* 48
proinflammatory cytokines.^{14,20,34,26,33} In addition, tachyzoite 49
to bradyzoite transition can occur spontaneously without 50
applying any stress factor, although mostly at a lower fre- 51
quency when compared to stress-induced conditions.^{13–18,21,22,27,23,39,59–61} After inoculation of tachyzoites 52
directly into the brains of mice, conversion to the bradyzoite 53

1 stage was evident within 2–3 days, *i.e.* earlier than required for
a robust anti-parasitic immune response.⁶² This suggested that
spontaneous differentiation of tachyzoites to bradyzoites
might have also occurred *in vivo*. The low frequency of
5 bradyzoite formation that is normally observed in the absence
of exogenous stress factors *in vitro* may indeed suffice *in vivo* to
guarantee the formation of enough tissue cysts and thereby
parasite persistence and transmission to new hosts.

The rate of spontaneous tachyzoite to bradyzoite differ-
entiation varies among *Toxoplasma* strains^{9,20,63} with the mouse-
avirulent type II or III strains generally switching at higher
rates than the mouse-virulent type I strains. Furthermore, the
infective stage of *Toxoplasma* may also be critical since high
frequency of tachyzoite to bradyzoite development was ob-
served after inoculation of sporozoites and several subsequent
15 rounds of rapid tachyzoite proliferation.⁶¹ Interestingly, bra-
dyzoite formation was preceded by, and critically depended
on, a parasite cell cycle shift towards slower growth.^{43,61}
Reduced parasite replication is thus not only linked to
stress-induced bradyzoite development (see above) but is also
crucial during spontaneous stage conversion. The importance
of a reduced parasite replication for spontaneous stage con-
version has recently been extended to the tachyzoite-brady-
zoite transition following the initial inoculation of mature
25 bradyzoite-containing cysts.⁴³ Consequently, a change in the
premitotic period of the cell cycle with the occurrence of a
novel G₂-like phase that is not present in rapidly dividing
tachyzoites has been associated with bradyzoite differentiation
of *Toxoplasma*.⁴³ It will be interesting to see whether the
occurrence of this novel G₂-like cell cycle phase represents a
30 default pathway after several rounds of tachyzoite replication
or rather it is a switch in the cell cycle progression that is
governed by environmental conditions that are sensed at a
distinct cell cycle checkpoint.

Impact of the host cell on bradyzoite development and cyst formation

Whether the host cell type is a determinant for *Toxoplasma*
tachyzoite–bradyzoite conversion is a matter of controversy.
Most cell lines indeed support at least some degree of tissue
cyst formation and this has led to the conclusion that the cell
type does not contribute greatly to bradyzoite formation.^{4,16,63}
It should be stressed, however, that this issue has never been
quantitatively compared. Furthermore, analyses of tachyzoite
yields *in vitro* indicated profound differences depending on the
cell type.⁶⁴ Practical considerations, *e.g.* availability, ease of
handling and maintenance, and robustness (the latter particu-
larly during stress-induced bradyzoite formation) have put
forward the use of human fibroblasts as a common host cell
type to study stage differentiation (for a list of cell types used
for the analyses of bradyzoite differentiation see ref. 4 and 63).
15 *In vivo*, however, it is well known that bradyzoite-containing
cysts of *Toxoplasma* are predominantly found in brain and
muscle tissues⁴ and within the brain, neurons appear to be the
major cell type for parasite persistence.⁶⁵ These findings have
raised doubts whether bradyzoite differentiation indeed occurs
independently of the host cell type. Certainly, depending on
the host species, cyst formation also occurs in visceral organs
including liver and kidney.⁴ The predominant localization of
tissue cysts in brain and muscles could, therefore, just reflect
the longevity of neurons and muscle cells or the immunologi-
cal environments in these tissues that would ensure the long
term persistence of the latent infection. Conversely, it can also
be hypothesized that neurons and muscle cells (or the respec-
tive tissues) provide an appropriate cellular environment that
readily sustains tissue cyst development. This view is sup-
ported by studies on *Toxoplasma* differentiation and develop-
ment that were carried out in primary rat CNS cells. The
results showed that bradyzoites developed spontaneously

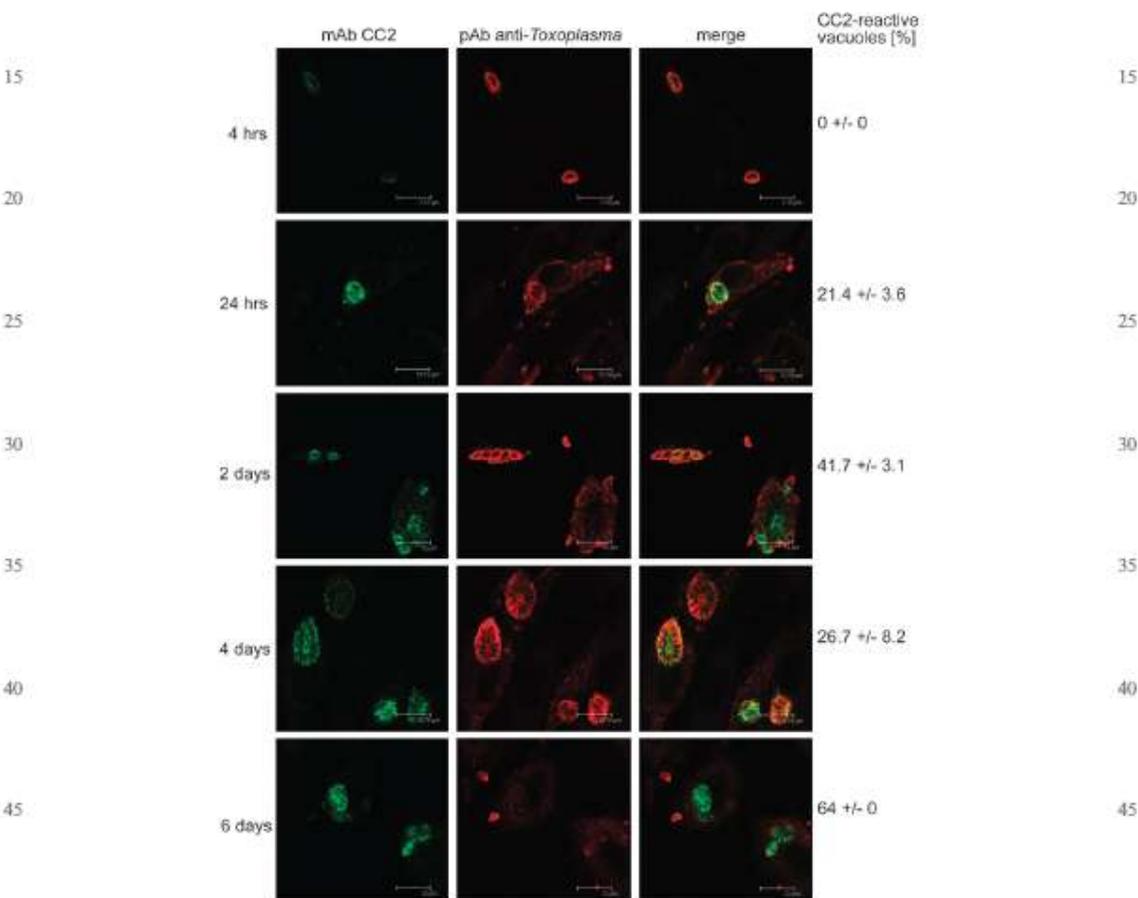


55 **Fig. 1** Differentiation of L6.C10 rat skeletal myoblast cells *in vitro* for subsequent infection with *T. gondii*. L6.C10 cells were cultivated in DMEM medium containing 10% fetal calf serum (FCS). Two days after seeding and formation of a nearly confluent monolayer, the cells were differentiated to myotubes by cultivation in medium with low serum content (2% FCS). Differentiation to mature skeletal muscle cells was judged by the occurrence of multiple syncytial myotubes at 7 days after seeding. In contrast, continued cultivation of L6.C10 control cells in medium with high serum content (10% FCS) predominantly sustained cell proliferation. Scale bar represents 100 μ m.

1 within neurons, astrocytes and microglia indicating that these cell types may serve as appropriate host cells for the initial steps of tissue cyst development.³⁸ Furthermore, Jones *et al.* reported on a cell culture system which supported the development and long-term maintenance of *T. gondii* tissue cysts in primary murine astrocytes over a period of 120 days¹⁴ which may be dependent on the specific host cell type.

We have recently started to investigate bradyzoite formation in skeletal muscle cells. Although *Toxoplasma* cysts have a predilection for muscle tissues,^{4,66} little attention has been

1 given to muscle cells as a host cell type to study *Toxoplasma*-host cell interaction or stage differentiation. This is particularly surprising, since persistence of *Toxoplasma* cysts in skeletal muscle tissue is of major relevance for the parasite transmission to humans *via* raw or undercooked meat. Using primary skeletal muscle cells that had been differentiated *in vitro* to mature myotubes, we found a remarkably high frequency of spontaneous tachyzoite to bradyzoite differentiation until six days after tachyzoite infection (Ferreira-da-Silva and Lüder, unpublished). As an alternative option to study the



50 Fig. 2 Tachyzoite-to-bradyzoite differentiation of *T. gondii* in L6.C10 rat skeletal muscle cells in the absence of exogenous stress factors. L6.C10 myoblasts were allowed to differentiate to myotubes in medium with 2% serum for 5 days as shown in Fig. 1. Thereafter, cells were infected with tachyzoites of the *T. gondii* NTE strain and were fixed at 4 h, 24 h, 48 h, 4 days and 6 days after infection. Parasites were immunostained with mAb CC2 which specifically recognizes bradyzoite-containing vacuoles (green fluorescence) along with a *Toxoplasma*-specific antiserum which recognizes all parasites (red fluorescence) by indirect double immunofluorescence staining. Representative images of each labelling were obtained by confocal laser scanning microscopy and were superimposed (merge). At 4 h post infection, tachyzoites of *T. gondii* did not bind the CC2 antibody, but reacted with the polyclonal anti-*Toxoplasma* serum. Increasing reactivity of parasites with mAb CC2 indicated differentiation towards the bradyzoite stage during the time course. Note that 6 days after infection, the reactivity of CC2-positive parasites (green) with the *Toxoplasma*-specific serum (red) had considerably diminished suggesting decreased expression of immunodominant tachyzoite-specific antigens (e.g. SAC-1) which are predominantly recognized by the polyclonal *Toxoplasma* antiserum. Data represent percentages (mean \pm S.E.M.) of CC2-reactive vacuoles.

1 interconversion of *Toxoplasma* in muscle cells *in vitro* we also
 employed the rat myoblast cell line L6C10. The cells were
 maintained subconfluent (in order to prevent spontaneous
 differentiation) in Dulbecco's ME medium supplemented with
 5 10% FCS and antibiotics and were regularly trypsinized and
 seeded at 1000–3000 cells cm⁻². In order to support the
 differentiation of myoblasts after they had just reached con-
 fluence, they were cultivated in DMEM with reduced serum
 content, i.e. 2% FCS and myotube formation was confirmed
 10 by phase contrast microscopy (Fig. 1). Importantly, after
 inoculation of such muscle cell cultures with *T. gondii*, sponta-
 neous differentiation of tachyzoites to bradyzoites was readily
 observed as determined by differential immunofluorescence
 microscopy. Bradyzoites developed at high frequencies during
 15 the first two days of infection (Fig. 2) thus confirming results
 from primary murine muscle cells. Although bradyzoite-con-
 taining vacuoles were also clearly detectable at later time
 points (Fig. 2), it has to be mentioned, however, that we were
 unable to reproducibly observe high frequencies of bradyzoite-
 20 containing vacuoles during sustained cultivation periods due
 to the degeneration of the cell culture monolayers. Never-
 theless, high frequencies of tachyzoite–bradyzoite switching in
 both primary and continuous skeletal muscle cells support the
 hypothesis that the cellular environment including the type of
 25 host cell may regulate *Toxoplasma* differentiation.

Besides the host cell type, the physiology of the host cell has
 recently been shown to have a major impact on bradyzoite
 differentiation. Changes in gene transcription after treatment
 of human fibroblasts with a trisubstituted pyrrole were accom-
 30 panied by reduced parasite replication and high frequencies of
 bradyzoite differentiation.³⁹ In fact, up-regulation of the hu-
 man cell division autoantigen (CDA)-1 was shown to trigger
 bradyzoite development and cyst formation as revealed by
 siRNA knockdown. Furthermore, overexpression of CDA-1
 35 sufficed to inhibit parasite growth and to induce expression of
 bradyzoite-specific antigens.³⁹ This study elegantly showed
 that the host cell transcriptome can directly influence
Toxoplasma stage differentiation. It will be interesting to see
 whether CDA-1 is also a major trigger for the commitment of
 40 *Toxoplasma* towards the bradyzoite stage during spontaneous
 stage conversion in certain cell types, e.g. neurons or muscle
 cells.

Conclusions

45 Our knowledge on the intriguing process of stage differentia-
 tion in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii* has in-
 creased considerably by using the approach of stress-induced
 bradyzoite formation *in vitro*. Whether cellular stress exerted
 by the host during infection is the major regulator of cyst
 50 formation *in vivo*, however, remains unknown. Recent ad-
 vances in the cellular and molecular biology of stage conver-
 sion of *Toxoplasma* point towards the type and the physiology
 of the host cells as critical determinants. This also puts
 forward the view that spontaneous bradyzoite development
 55 in an appropriate cellular environment may be more impor-
 tant as previously thought. Certainly, we are still far from a
 complete picture of the regulation of stage conversion of *T.*
gondii but we are, nevertheless, on a good way to understand
 the molecular basis for bradyzoite differentiation and parasite

1 persistence. In further analyses, muscle cells may be a valuable
in vitro model which will allow us—beside neurons—to in-
 5 vestigate *Toxoplasma* stage conversion under conditions that
 more closely resembles the physiological environment in the
 infected host.

Acknowledgements

We are grateful to the Bundesministerium für Bildung und
 Forschung for financial support of the authors' work related
 10 to this article (TOXONET01, grant 01 KI 0766 to C. G. K.
 Lüder). The support of M. F. Ferreira-da-Silva by the
 Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD)/Coorde-
 nação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior
 (CAPES), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Cien-
 15 tífico e Tecnológico (CNPq), the Instituto Oswaldo Cruz
 (FIOCRUZ) and the Katholischer Akademischer Austausch-
 dienst (KAAD) is highly appreciated.

References

- 1 F. Dzierżynski, M. Nishi, L. Outko and D. S. Roos, Dynamics of
Toxoplasma gondii differentiation, *Eukaryot. Cell*, 2004, 3,
 992–1003.
- 2 A. M. Tenter, A. R. Heckeroth and L. M. Weiss, *Toxoplasma*
gondii: from animals to humans, *Int. J. Parasitol.*, 2000, 30,
 1217–1228.
- 3 J. G. Montoya and O. Liesenfeld, Toxoplasmosis, *Lancet*, 2004,
 363, 1965–1976.
- 4 J. P. Dubey, D. S. Lindsay and C. A. Speer, Structures of
Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and
 biology and development of tissue cysts, *Clin. Microbiol. Rev.*,
 1998, 11, 267–299.
- 5 L. M. Weiss and K. Kim, The development and biology of
 bradyzoites of *Toxoplasma gondii*, *Front. Biosci.*, 2000, 5,
 D391–405.
- 6 J. K. Frankel, Letter: Cytomegalovirus infection and *Toxoplasma*,
Am. J. Dis. Child., 1973, 16, 860–861.
- 7 M. J. Hogan, C. Yoneda, L. Fenney, P. Zweigart and A. Lewis,
 Morphology and culture of *Toxoplasma*, *Arch. Ophthalmol.*, 1960,
 64, 655–667.
- 8 W. Bolme, M. Holpert and U. Gross, Stage differentiation of the
 protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, *Immunobiology*, 1999, 201,
 248–254.
- 9 J. R. Radke, M. S. Bahinka, A. J. Mackey, J. B. Radke, D. S. Roos
 and M. W. White, The transcriptome of *Toxoplasma gondii*, *BMC*
 40 *Biol.*, 2005, 3, 26–43.
- 10 U. Gross, W. Bolme, M. Soets and J. F. Dubremetz, Develop-
 mental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of
Toxoplasma gondii, *Parasitol. Today*, 1996, 12, 30–33.
- 11 J. P. Dubey, C. A. Speer, S. K. Shen, O. C. Kwok and J. A. Blair,
 Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity,
 45 and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts, *J.*
Parasitol., 1997, 83, 870–882.
- 12 J. P. Dubey, Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*, *Int. J.*
Parasitol., 1998, 28, 1019–1024.
- 13 R. L. Hoff, J. P. Dubey, A. M. Bahbehani and J. K. Frankel,
Toxoplasma gondii cysts in cell culture: new biologic evidence, *J.*
Parasitol., 1977, 63, 1121–1124.
- 14 T. C. Jones, K. A. Benz and P. Erb, *In vitro* cultivation of
Toxoplasma gondii cysts in astrocytes in the presence of gamma
 interferon, *Infect. Immun.*, 1986, 51, 147–156.
- 15 M. L. Darda, B. Bouteille, M. J. Laboulet, A. Loubet and M.
 Pastré-Alexandre, *Toxoplasma gondii* ultrastructural study of
 cystic formations observed in human fibroblast culture, *Ann.*
 55 *Parasitol. Hum. Comp.*, 1989, 64, 403–411.
- 16 D. S. Lindsay, J. P. Dubey, B. L. Bingham and M. Toivio-
 Kinnunen, Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma*
gondii in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporo-
 zoites, *J. Parasitol.*, 1991, 77, 126–132.

- 17 T. D. McHugh, A. Gbewonyo, J. D. Johnson, R. E. Holliman and P. D. Butcher, Development of an *in vitro* model of *Toxoplasma gondii* cyst formation, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1993, 114, 325–332.
- 18 D. S. Lindsay, M. A. Toivio-Kinnunen and B. L. Blagburn, Ultrastructural determination of cystogenesis by various *Toxoplasma gondii* isolates in cell culture, *J. Parasitol.*, 1993, 79, 289–292.
- 19 M. Soete, B. Fortier, D. Camus and J. F. Dubremetz, *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*, *Exp. Parasitol.*, 1993, 76, 259–264.
- 20 W. Bohne, J. Heesemann and U. Gross, Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion, *Infect. Immun.*, 1994, 62, 1761–1767.
- 21 M. Soete and J. F. Dubremetz, *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion *in vitro*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1996, 219, 76–80.
- 22 A. Lane, M. Soete, J. F. Dubremetz and J. E. Smith, *Toxoplasma gondii*: appearance of specific markers during the development of tissue cysts *in vitro*, *Parasitol. Res.*, 1996, 82, 340–346.
- 23 J. Ricard, H. Pelloux, U. Gross, A. Meunier and P. Ambroise-Thomas, Induction of *Toxoplasma gondii* cystogenesis and multiplication arrest by treatments with a phosphatidylcholine-specific phospholipase C inhibitor, *J. Parasitol.*, 1999, 85, 583–585.
- 24 E. V. Guimarães, L. de Carvalho and H. S. Barbosa, Primary culture of skeletal muscle cells as a model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis, *J. Parasitol.*, 2008, 94, in press.
- 25 M. Salm, H. G. Fischer, U. Gross, I. Reiter-Owana and H. M. Seitz, Cyst formation by *Toxoplasma gondii* *in vivo* and in brain-derived culture: a comparative morphology and immunocytochemistry study, *Parasitol. Res.*, 1997, 83, 659–665.
- 26 W. Bohne, J. Heesemann and U. Gross, Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages, *Infect. Immun.*, 1993, 61, 1141–1145.
- 27 L. M. Weiss, D. Laplace, P. M. Takvorian, H. B. Tanowitz, A. Cali and M. Wittner, A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites, *J. Euk. Microbiol.*, 1995, 42, 150–157.
- 28 M. Soete, D. Camus and J. F. Dubremetz, Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* *in vitro*, *Exp. Parasitol.*, 1994, 78, 361–370.
- 29 B. Fux, J. Nawas, A. Khan, D. B. Gill, C. Su and L. D. Sibley, *Toxoplasma gondii* strains defective in oral transmission are also defective in developmental stage differentiation, *Infect. Immun.*, 2007, 75, 2580–2590.
- 30 L. M. Weiss, Y. F. Ma, P. M. Takvorian, H. B. Tanowitz and M. Wittner, Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response, *Infect. Immun.*, 1998, 66, 3295–3302.
- 31 I. D. Manger, A. Hehl, S. Parmley, L. D. Sibley, M. Marra, L. Hilker, R. Waterston and J. C. Boothroyd, Expressed sequence tag analysis of the bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*: identification of developmentally regulated genes, *Infect. Immun.*, 1998, 66, 1632–1637.
- 32 M. D. Ckery, U. Singh, I. J. Blader, J. L. Brewer and J. C. Boothroyd, *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression, *Eukaryot. Cell*, 2002, 1, 329–340.
- 33 Y. Lei, M. Davey and J. Ellis, Autofluorescence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* cysts *in vitro*, *J. Parasitol.*, 2005, 91, 17–23.
- 34 Y. Suzuki, M. A. Orellana, R. D. Schreiber and J. S. Remington, Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*, *Science*, 1988, 240, 516–518.
- 35 C. Lang, U. Groß and C. G. K. Lüder, Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*, *Parasitol. Res.*, 2007, 100, 191–203.
- 36 C. F. Nathan, H. W. Murray, M. E. Wiebe and B. Y. Rubin, Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity, *J. Exp. Med.*, 1983, 158, 670–689.
- 37 E. R. Pfefferkorn, M. Eckel and S. Rebhun, Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1986, 20, 215–224.
- 38 C. G. K. Lüder, M. Giraldo-Velasquez, M. Sendtner and U. Gross, *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation, *Exp. Parasitol.*, 1999, 93, 23–32.
- 39 J. R. Radke, R. G. Donald, A. Eibs, M. E. Jerome, M. S. Behnke, P. Liberator and W. W. White, Changes in the expression of the human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma gondii* growth and development, *PLoS Pathogens*, 2006, 2, e105.
- 40 L. A. Kirkman, L. M. Weiss and K. Kim, Cyclic nucleotide signaling in *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation, *Infect. Immun.*, 2001, 69, 148–153.
- 41 S. Tomavo and J. C. Boothroyd, Interconnection between organelle functions, development and drug resistance in the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*, *Int. J. Parasitol.*, 1995, 25, 1293–1299.
- 42 U. Gross and F. Pohl, Influence of antimicrobial agents on replication and stage conversion of *Toxoplasma gondii*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1996, 219, 235–245.
- 43 J. R. Radke, M. N. Gierini, M. Jerome and M. W. White, A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2003, 131, 119–127.
- 44 D. J. P. Ferguson, J. Huskinson-Mark, F. G. Araujo and J. S. Remington, An ultrastructural study of the effect of treatment with atovaquone in brains of mice chronically infected with the ME49 strain of *Toxoplasma gondii*, *Int. J. Exp. Path.*, 1994, 75, 111–116.
- 45 R. G. Donald, J. Allocco, S. B. Singh, B. Nare, S. P. Salowe, J. Witsie and P. A. Liberator, *Toxoplasma gondii* cyclic GMP-dependent kinase: chemotherapeutic targeting of an essential parasite protein kinase, *Eukaryot. Cell*, 2002, 1, 317–328.
- 46 O. S. Selawry, M. N. Goldstein and T. McCormick, Hyperthermia in tissue-cultured cells of malignant origin, *Cancer Res.*, 1957, 17, 785–791.
- 47 K. Henke and L. Dethlefsen, Heat fractionation and thermotolerance: a review, *Cancer Res.*, 1978, 38, 1843–1851.
- 48 R. Morimoto, A. Tissieres and C. Georgopoulos, *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, Harbor, NY, 1994.
- 49 W. Bohne, U. Gross, D. J. Ferguson and J. Heesemann, Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants, *Mol. Microbiol.*, 1995, 16, 1221–1230.
- 50 C. A. Dobbin, N. C. Smith and A. M. Johnson, Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine *Toxoplasma* infection via immunomodulation of host NF- κ B and nitric oxide, *J. Immunol.*, 2002, 169, 958–965.
- 51 P. C. Echeverria, M. Matrajt, O. S. Harb, M. P. Zappia, M. A. Costa, D. S. Roos, J. F. Dubremetz and S. O. Angel, *Toxoplasma gondii* Hsp90 is a potential drug target whose expression and subcellular localization are developmentally regulated, *J. Mol. Biol.*, 2005, 350, 723–734.
- 52 W. Bohne, C. A. Hunter, M. W. White, D. J. Ferguson, U. Gross and D. S. Roos, Targeted disruption of the bradyzoite-specific gene BAG1 does not prevent tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1998, 92, 291–301.
- 53 N. M. Silva, R. T. Gazzinelli, D. A. O. Silva, E. A. V. Ferro, L. H. Kasper and J. R. Mineo, Expression of *Toxoplasma gondii*-specific heat shock protein 70 during *in vivo* conversion of bradyzoites to tachyzoites, *Infect. Immun.*, 1998, 66, 3959–3963.
- 54 B. A. Fox, J. P. Cigley and D. J. Bizik, *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for *de novo* arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation, *Int. J. Parasitol.*, 2004, 34, 323–331.
- 55 W. Bohne and D. S. Roos, Stage-specific expression of a selectable marker in *Toxoplasma gondii* permits selective inhibition of either tachyzoites or bradyzoites, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1997, 88, 115–126.
- 56 B. Yahiaoui, F. Dzierzinski, A. Bernigaud, C. Slomianny, D. Camus and S. Tomavo, Isolation and characterization of a subtractive library enriched for developmentally regulated transcripts expressed during encystation of *Toxoplasma gondii*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1999, 99, 225–235.

1 57 L. A. Kirkman, L. M. Weiss and K. Kim, Cyclic nucleotide signaling in *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation, *Infect. Immun.*, 2001, **69**, 148–153.

58 M. S. Eaton, L. M. Weiss and K. Kim, Cyclic nucleotide kinases and tachyzoite-bradyzoite transition in *Toxoplasma gondii*, *Int. J. Parasitol.*, 2006, **36**, 107–114.

59 I. Popiel, M. Gold and L. Choromanski, Tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* T-263 in cell culture, *J. Eukaryot. Microbiol.*, 1994, **41**, 17S.

60 I. Popiel, M. C. Gold and K. S. Booth, Quantification of *Toxoplasma gondii* bradyzoites, *J. Parasitol.*, 1996, **82**, 330–332.

10 61 M. E. Jerome, J. R. Radke, W. Bohne, D. S. Roos and M. W. White, *Toxoplasma gondii* bradyzoites form spontaneously during sporozoite-initiated development, *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 4838–4844.

62 J. P. Dubey and J. K. Frenkel, Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts, *J. Protozool.*, 1976, **23**, 537–546.

63 T. D. McHugh, R. E. Holliman and P. D. Butcher, The *in vitro* model of tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*, *Parasitol. Today*, 1994, **10**, 281–285.

64 R. Evans, J. M. Chatterton, D. Ashburn, A. W. Joas and D. O. Ho-Yen, Cell-culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1999, **18**, 879–884.

65 D. J. P. Ferguson and W. M. Hutchinson, The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice, *Virchows Archiv A*, 1987, **411**, 39–43.

66 L. Jacobs, *Toxoplasma* and toxoplasmosis, *Adv. Parasitol.*, 1967, **5**, 1–45.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

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

**CONVERSÃO *IN VITRO* DE TAQUIZOÍTOS EM BRADIZOÍTOS DE *TOXOPLASMA*
GONDII EM CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS**

por

MARIALICE DA FONSECA FERREIRA DA SILVA

Rio de Janeiro

2008

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

**CONVERSÃO *IN VITRO* DE TAQUIZOÍTOS EM BRADIZOÍTOS DE *TOXOPLASMA*
GONDII EM CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS**

por

MARIALICE DA FONSECA FERREIRA DA SILVA

Tese apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências na área de
Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Dra. Helene Santos Barbosa

Rio de Janeiro
2008

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

Esta tese intitulada:

CONVERSÃO *IN VITRO* DE TAQUIZOÍTOS EM BRADIZOÍTOS DE *TOXOPLASMA GONDII* EM CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS

Apresentada por:

MARIALICE DA FONSECA FERREIRA DA SILVA

Banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra Joseli Lannes Vieira – LABAIIIR / Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz (presidente)

Dr. Renato Augusto DaMatta – CBB/ Universidade Norte Fluminense

Prof. Dr. Oliver Liesenfeld – Charité Medical School Berlin - Berlin

Dra. Lais de Carvalho – LHE/Instituto de Biologia/UERJ (suplente)

Dr. Erick V. Guimarães – LBE/ Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz (suplente)

Tese defendida e aprovada em 22 de julho de 2008.

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

S586

Silva, Marialice da Fonseca Ferreira da

Conversão in vitro de taquizoitos em bradizoitos de toxoplasma gondii em células musculares esqueléticas / Marialice da Fonseca Ferreira da Silva. – Rio de Janeiro, 2008.

xii, 107 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2008.

Bibliografia: f. 58-75

1. Toxoplasma gondii. 2. Estágio conversão. 3. Músculo esquelético. 4. Diferenciação. 5. Bradizoitos. I. Título.

CDD 593.19

Esta tese foi desenvolvida sob orientação da Dra. Helene Santos Barbosa no Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ e no Instituto de Microbiologia Médica da Universidade de Göttingen, Alemanha, como parte do programa de Doutorado Sanduíche da CAPES e teve o apoio financeiro das seguintes entidades:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

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

Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)

Deutsch Akademischer Austauschdienst (DAAD)

Katholischer Akademischer Austauschdienst (KAAD) - KAAD/KHG Göttingen

Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde – PAPES IV

Data da matrícula no programa de Mestrado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz: agosto de 2004.

Eu dedico esta tese aos grandes amores da minha vida: minha querida mãe Helena e ao meu noivo Christoph Heider.

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Dra Helene Barbosa pelo exemplo de responsabilidade, credibilidade, amizade, lealdade, profissionalismo, pela minha formação, pelos caminhos que você abriu, pela amizade. Serei eternamente grata por tudo. Obrigada. Muito obrigada.

Ao Prof Dr Uwe Gross e especialmente ao Dr Carsten Lüder, pela excelente oportunidade, um marco na minha carreira científica.

Ao Dr. Wolfgang Bohne, pelas discussões sobre estágio conversão do *Toxoplasma*.

A Dra Solange pela revisão desta tese e pelos valores que passa aos alunos em nosso dia a dia.

À Alessandra Ferreira e a Mariana Acquarone pela amizade, ensinamentos sobre a cultura das CMEs e por vibrarem com as minhas conquistas.

À querida Lourdes, pelo excelente apoio, prontidão e pela torcida em cada etapa das minhas aventuras científicas;

À minha equipe do LBE e em especial ao Erick, por tudo que aprendi com você.

Eu sou grata a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e ao Deutsch Akademischer Austauschdienst (DAAD) que suportaram financeiramente o meu Doutorado Sanduíche.

Ao Dr Thomas Krüggeler, do serviço de bolsas de extensão a pesquisadores estrangeiros (Katholischer Akademischer Ausländer-Dienst - KAAD) e à Dr. Cecília Leon Ramirez (KHG – Göttingen) por me ampararem no momento de minha extensão no doutorado Sanduíche.

Aos grandes amigos e pesquisadores do antigo Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular, hoje LBC, LBE, LUC e ainda ao grupo de biofilmes, obrigada pela amizade, pela torcida, pelo ambiente espetacular de trabalho.

Aos grandes amigos que fiz na Universidade de Göttingen.

À minha família (minhas mães Helena e Marilza, minha irmã Elisabete e minha sobrinha Maria Rita) por tanto amor.

Em especial à minha mãe Helena, pelos ensinamentos de coragem, determinação, retidão, perseverança, fé e por ser a minha melhor amiga.

À Kelly Salomão, Mariana Waghabi e Carolina Spiegel pelo laço de real de fraternidade. A Juliana Dias, a Tatiana Galvão e Daniel Adesse pela cumplicidade e amizade que nunca vi igual. Sem vocês... eu nem sei....

Ao Christoph e à família Heider pelo amor imensurável, confiança e amizade.

Por último, e mais importante ao meu Deus Pai todo poderoso.

RESUMO

A diferenciação no desenvolvimento é um processo fundamental em organismos vivos. É essencial em organismos multicelulares e comum entre procariotos e eucariotos unicelulares. No caso de protozoários parasitas, tal diferenciação é freqüentemente um processo obrigatório que distingue estágios do ciclo de vida sendo requerido para (i) reprodução sexual, (ii) transmissão entre os hospedeiros mamíferos e vetores invertebrados, ou para (iii) sobrevivência dentro de diferentes nichos no hospedeiro. Embora seja do conhecimento que *Toxoplasma gondii* forma cistos preferencialmente no cérebro e na musculatura esquelética, pouca atenção tem sido dada às células musculares esqueléticas como um tipo celular para estudo da estágio-conversão do parasito. A persistência na musculatura esquelética é crítica para a sua transmissão para humanos através da ingestão de carne crua ou mal passada. Na presente tese, culturas primárias de células musculares esqueléticas (CME) foram altamente diferenciadas, apresentando miotubos que contraíam espontaneamente e expressavam marcadores específicos, tais como Myf5, MyoD e desmina. Com o objetivo de investigar *in vitro* a diferenciação do *Toxoplasma*, CME foram infectadas com taquizoítos de *Toxoplasma* e a estágio-conversão entre taquizoítos e bradizoítos analisadas até seis dias após infecção por imunofluorescência. A diferenciação dos taquizoítos teve início espontaneamente após 1 dia de infecção apresentando a seguinte taxa de vacúolos contendo bradizoítos: 0 % (4h), 23,8 ±3,4 % (1 dpi); 31,0 ± 2,0 % (2 dpi); 33,0 ±3,5 % (4dpi) e 46,0 ±3,5 % (6dpi). Após 2 e 4 dias de infecção, vacúolos contendo bradizoítos e rosetas de *Toxoplasma* em estágio conversão assincrônica foram detectados. Com o objetivo de checar se o tipo celular é determinante neste intrigante fenômeno, os mesmos experimentos foram realizados em dois outros tipos de células hospedeiras: linhagem de mioblasto (L6C10) de rato diferenciada *in vitro* em miotubos maduros e em linhagem de fibroblasto de camundongo (L929). Altas taxas foram detectadas na linhagem de mioblasto L6.C10: 35,2 ± 4, 6 % (4 dpi) e 64% (6 dpi). Em contraste, na linhagem de fibroblasto de rato (L929), a taxa de diferenciação do *Toxoplasma* não alcançou 20%. Além disso, quando analisados por RT-PCR em tempo real, o RNA total de culturas de CMEs infectadas com taquizoítos de *Toxoplasma* continha quantidades crescentes de transcritos de ENO1, um marcador específico para o estágio bradizoíta. Nós também desenvolvemos experimentos de estágio conversão induzida, aplicando condições de estresse exógenos, tais como pH alcalino e citocina. Nossos dados revelaram que altas taxas de estágio conversão do *Toxoplasma* ocorrem em CME, sem requerer fatores de estresse exógenos, tais como drogas, mudanças na temperatura ou pH. Nós acreditamos que CMEs possam apresentar um nicho apropriado para o *Toxoplasma* estabelecer a fase crônica da infecção e desta forma, ser um potente/modelo celular para o estudo do intrigante processo de diferenciação de taquizoítos-bradizoítos *in vitro*.

ABSTRACT

Developmental differentiation is a fundamental process in living organisms. It is essential in multicellular organisms and is common among prokaryotes and unicellular eukaryotes. In the case of protozoan parasites, such differentiation most frequently is an obligatory process with distinct life cycle stages being required for (i) sexual reproduction, (ii) for transmission between mammalian hosts and invertebrates vectors, or (iii) for survival within distinct niches of the host. Although it is already known that *Toxoplasma gondii* form cysts preferentially in the brain and in the skeletal muscles, little attention has been paid to skeletal muscle cells as a cell type to study *Toxoplasma* stage conversion. Persistence within muscle tissue is critical for parasite transmission to humans via raw or undercooked meat. In the present thesis work, primary cultures of skeletal muscle (SkMC) were highly differentiated, displaying myotubes which contracted spontaneously *in vitro* and expressed markers specific to SkMC, such as myf5, myoD and desmin. Owing to investigate *in vitro* differentiation of *Toxoplasma*, SkMCs were infected with *Toxoplasma* tachyzoites and tachyzoite-bradyzoite stage conversion analysed till 6 days post infection by immunofluorescence. The tachyzoite differentiation started spontaneously at 1 day post infection, displaying the following rate of vacuoles containing bradyzoites: 0 % (4h), 23.8 ± 3.4 % (1 dpi); 31.0 ± 2.0 % (2 dpi); 33.0 ± 3.5 % (4 dpi) and 46.0 ± 3.5 % (6 dpi). At 2 and 4 dpi, vacuoles containing bradyzoites and rosettes of *Toxoplasma* in asynchronous stage conversion were detected. In order to check if the host cell was determinant to this intriguing phenomenon, the same experiments were carried in 2 others different host cell: a rat myoblast cell line (L6C10) differentiated *in vitro* into mature myotubes and a mouse fibroblast cell line (L929). High rates were detected in the L6.C10 myoblast cell line: 35.2 ± 4.6 % (4 dpi) and 64% (6 dpi). In contrast, in mouse fibroblast cell line (L929), the rate of *Toxoplasma* differentiation did not reach 20%. In addition, when analysed by real time RT-PCR, total RNA from SkMC infected by *Toxoplasma* tachyzoites contained increasing amounts of bradyzoite-specific ENO1 transcripts until 6 dpi. We also carried experiment inducing the stage conversion, by applying exogenous stress conditions, as alkaline medium and cytokine. Our data show that high rates of *Toxoplasma* stage conversion takes place in SkMC, without exogenous stress factors being required as drugs, changes in temperature or pH. We believe that SkMC might be an appropriate niche to the parasite to establish the chronic phase of the infection and therefore, a potent cell model to study the intriguing process of tachyzoite to bradyzoite differentiation *in vitro*.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	X
I. INTRODUÇÃO	1
1. <i>Toxoplasma gondii</i> - o modelo Apicomplexa	1
2. Biologia do <i>Toxoplasma</i>	2
3. Toxoplasmose em humanos	6
4. <i>T. gondii</i> e a célula hospedeira: invasão e formação do vacúolo parasitóforo	8
5. Tropismo celular e estágio conversão do <i>Toxoplasma</i>	11
6. A célula muscular esquelética	14
6.1 Biologia celular e molecular da miogênese	14
6.2. A cultura primária de célula muscular esquelética	16
II. OBJETIVOS	19
III. MATERIAIS E MÉTODOS	20
1. Isolamento e cultura de células musculares esqueléticas	20
2. Manutenção e diferenciação de linhagem de mioblasto de rato (L6. C10)	21
3. Cultura de linhagem de fibroblasto de camundongo (L929)	21
4. Cultivo do <i>Toxoplasma</i> e infecção das células	22
5. Ensaio de imunofluorescência	22
5.1. Monitoramento da diferenciação das células musculares <i>in vitro</i>	22
5.2. Monitoramento da diferenciação dos parasitos <i>in vitro</i>	23
6. Análises por RT-PCR quantitativo e semiquantitativo (q RT-PCR)	23
6.1. Da expressão genes-músculo específicos	23
6.2. De genes estágio específico do <i>Toxoplasma</i>	24
7. Estágio conversão do <i>Toxoplasma</i> induzido por estresse exógeno	25
7.1. Indução da estágio conversão por aumento do pH e ausência de CO ₂	25
7.2. Indução do estágio conversão com IFN gama em presença de LPS	25
IV. RESULTADOS	27
1. Estabelecimento da miogênese de culturas primárias de CME	27
1.1. Por microscopia de contraste de fase	27
1.2. Por microscopia de fluorescência	27

1.3. Monitoramento da expressão gênica de proteínas músculo-específico	27
2. Estágio conversão taquizoíto-bradizoíto de <i>T. gondii</i> em CME	31
2.1. Monitoramento por imunofluorescência	31
2.2. Monitoramento por qRT-PCR	34
3. Monitoramento da diferenciação de células de linhagem de mioblasto de rato (L6. C10)	34
4. Monitoramento da conversão de taquizoíto-bradizoíto de <i>T. gondii</i> em linhagens celulares de músculo (L6C10) e de fibroblasto (L929)	38
5. Indução do estágio conversão	46
5.1. Indução por aumento do pH e ausência de CO ₂ em cultura primária de CME	46
5.2. Indução com IFN- γ em presença e na ausência de LPS	46
V DISCUSSÃO	48
VI CONCLUSÕES	57
VII BIBLIOGRAFIA	58
VIII ANEXOS	76
ANEXO I – <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoite -to- bradyzoite conversion in skeletal muscle cells in the absence of exogenous stress factors	
ANEXO II – Stress-related and spontaneous stage differentiation of <i>Toxoplasma gondii</i>	

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. *Toxoplasma gondii* - o modelo Apicomplexa

Neste ano de 2008 comemora-se os 100 anos da descrição do *Toxoplasma gondii* por Nicolle e Manceaux, no norte da África, e por Splendore no Brasil. A designação da espécie deste parasito provém do nome de um roedor africano (*Ctenodactylus gondi*) do qual este parasito foi originalmente isolado (Nicolle e Manceaux, 1909; Black e Boothroyd, 2000).

O *T. gondii* é um protozoário classificado como Coccídeo, pertencente ao filo Apicomplexa, que inclui um grande número de parasitos de animais e de humanos, responsáveis por doenças muito conhecidas, tais como malária, toxoplasmose, coccidiose e criptosporidiose (Dubremetz e cols., 1993).

De todos os apicomplexas, o *T. gondii* é o mais acessível experimentalmente, uma vez que: (i) esses parasitos são capazes de infectar *in vitro* qualquer célula nucleada; (ii) os estágios patogênicos são facilmente propagáveis em cultura, produzindo-se quantidades satisfatórias de parasito para experimentação; (iii) o modelo em camundongos é bem estabelecido; (iv) foi o primeiro protozoário obrigatoriamente intracelular a ser transformado utilizando-se DNA exógeno (Donald e Roos, 1993; Kim e cols., 1993), possibilitando assim, o desenvolvimento de ferramentas moleculares de genética reversa para a manipulação de seu genoma (Boothroyd e cols., 1997; Soete e cols., 1999), e ainda, (v) pelo fato de um novo banco de dados das chamadas “expressed sequence tags” (EST), que são etiquetas de seqüências expressas produzidas a partir de bibliotecas de cDNA, ter sido criado para o *T. gondii*. Desta forma, por conta destas facilidades experimentais, o *T. gondii* emerge como um dos mais importantes modelos para o estudo da biologia dos apicomplexas, que incluem mais de 5000 espécies de parasitos (Wilson e cols., 1996; Roos e cols., 1999; revisto em Black e Boothroyd 2000, e em Kim e Weiss, 2004). Há significantes diferenças biológicas entre o *Toxoplasma* e os outros parasitos deste filo, principalmente com relação ao ciclo de biológico que não foi conservado em todas as espécies (Kim e Weiss, 2004). Este protozoário tão bem adaptado é caracterizado por ser um parasito oportunista de ampla distribuição geográfica e por formar cistos teciduais freqüentemente encontrados no sistema nervoso central e na musculatura esquelética de seus hospedeiros, onde persistem

dormentes por longos períodos, levando a uma infecção de longo termo (Hoare, 1972, Gross e cols., 1997; Ellis e cols., 2004).

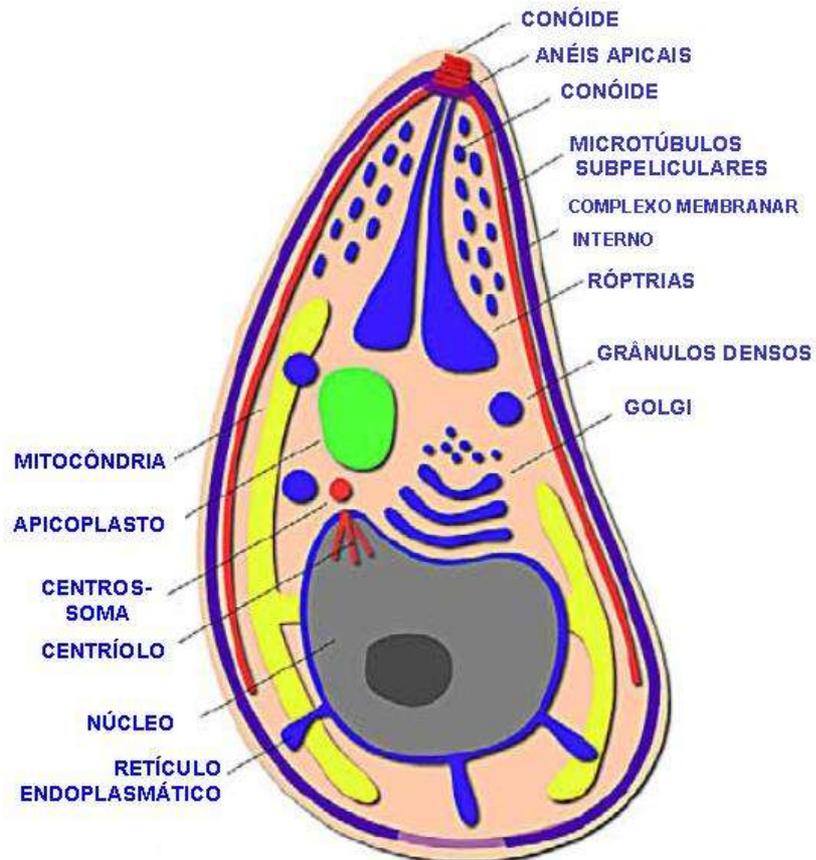
O estabelecimento de uma infecção persistente é uma das principais características deste parasito, sendo necessária para manutenção do seu ciclo de vida. Este fato e a habilidade do *T. gondii* em infectar um amplo espectro de células de vertebrados de sangue quente e de se desenvolver dentro de toda célula nucleada estudada até o momento, faz com que seja um dos protozoários mais bem sucedidos dentre os parasitos obrigatoriamente intracelulares (Boothroyd e cols., 1998).

2. Biologia do *T. gondii*

O *Toxoplasma* se caracteriza pela forma alongada, de meia lua crescente, apresentando uma extremidade mais afilada na região anterior do corpo e mede cerca 7 μm de comprimento e 2 μm de largura, com pequenas variações entre as três formas infectivas (Harboe e Erichsen, 1954; Hogan e cols., 1960).

O *T. gondii* apresenta todas as estruturas típicas de células eucariotas (Esquema 1), sendo a presença do complexo apical (formado pelo conóide e anéis apicais) um importante diferencial que caracteriza o filo apicomplexa (Esquema 2). Além do complexo apical, o *Toxoplasma* possui organelas secretoras como róptrias, micronemas e grânulos densos que desempenham um importante papel na invasão, formação e manutenção do vacúolo parasitóforo, garantindo a sua permanência na célula hospedeira (Joiner e Roos, 2002; Martin e cols., 2007) (Esquema 1). O conóide mede cerca de 250 nm de diâmetro e 280-360 nm de comprimento, formado basicamente por 6-8 microtúbulos e um par central interno, assemelhando-se a uma mola que pode se estender ou retrair dentro do anel polar apical (revisto em Dubey e cols., 1998b; Morissete e Sibley, 2002) (Esquema 2).

O *Toxoplasma* é envolto por uma membrana trilaminar (Dubey e cols., 1998) e contém um plastídeo vestigial, chamado de plastídeo apicomplexa ou apicoplasto, indispensável ao parasito e que vem recebendo atenção especial desde sua



(Reproduzido e adaptado de Striepen e cols., 2007)

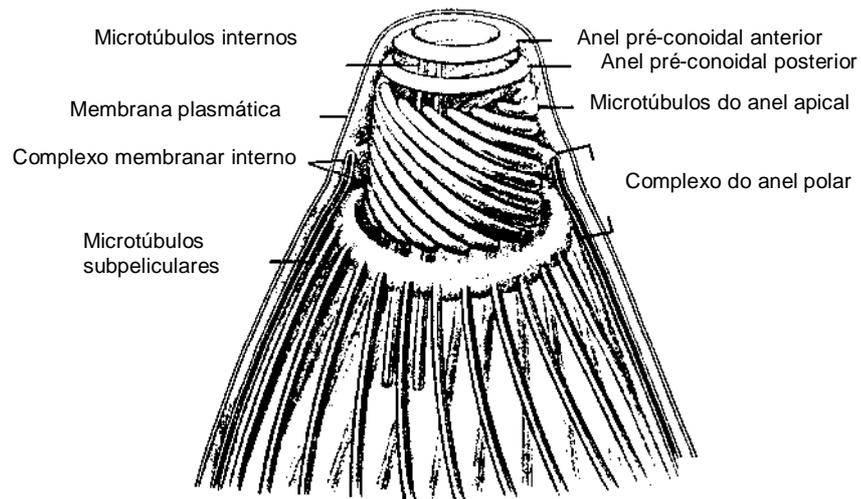
Esquema 1. Representação esquemática de um zoótipo, mostrando a ultra-estrutura do *T.gondii*.

descrição (Wilson e cols., 1995; McFadden e cols., 1996; Kohler e cols., 1997; Waller e cols., 1998). Esta organela é envolta por múltiplas membranas, indicando ter sido adquirida por endossimbiose secundária (Kohler e cols., 2006). A endossimbiose primária consiste na incorporação de um procarionto por um eucarioto e os plastídeos apresentam somente duas membranas. Por outro lado, na endossimbiose secundária, um eucarioto heterotrófico fagocita um eucarioto fotossintético, gerado por uma endossimbiose primária, e assim os plastídeos apresentam quatro membranas (Waller e cols., 1998).

Como o *Toxoplasma* apresentar enzimas glicolíticas homólogas às de plantas e não à de animais, esta organela é uma forte candidata para o desenho de novas abordagens terapêuticas (Kohler e cols., 1997; Ralph e cols., 2001; Seeber, 2003),

além de ser objeto de estudos evolutivos (Willianson e cols., 1994; Egea e Lang-Unasch, 1995; Dziarszinski e cols., 1999).

A mitocôndria do *Toxoplasma* também foi gerada por um processo endossimbiótico e, assim como o apicoplasto, leva seu próprio genoma (Wilson e cols., 1996).



Reproduzido de Nichols & Chiappino (1987)

Esquema 2. Esquema detalhado da região apical do *T. gondii*

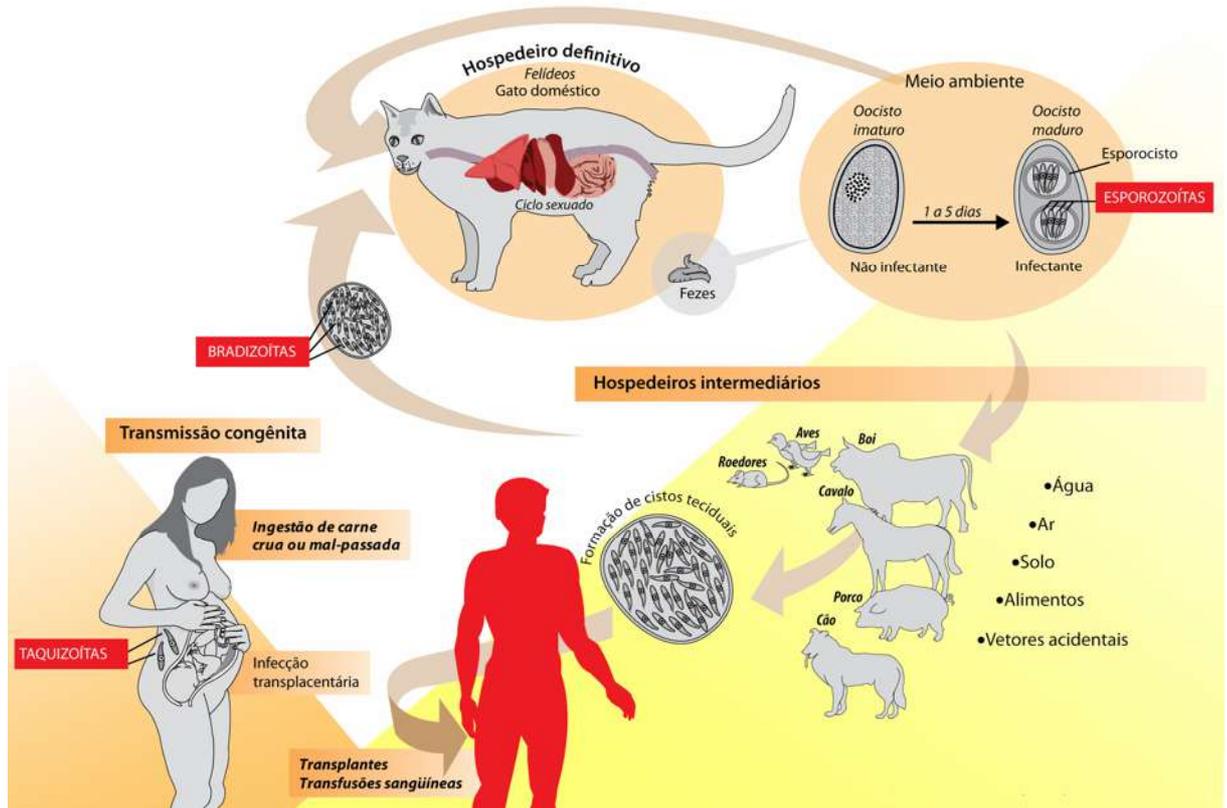
Em termos ultra-estruturais há grandes similaridades entre taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos de *Toxoplasma*, que apresentam organelas características e clássicas dos parasitos apicomplexas (Esquema 1). No entanto, após estágio diferenciação, há diferenças fisiológicas marcantes entre as 3 formas do parasito, incluindo alterações em sua superfície, metabolismo, além da indução de genes associados a essas mudanças (Denton e cols., 1996; Ferguson, 2004, Speer e Dubey, 2005). Diferenças também ocorrem no modo de divisão dos parasitos, e na velocidade com a qual se multiplicam. Os taquizoítos se multiplicam rapidamente dentro do interior dos vacúolos parasitóforos (VP), formando rosetas, lisando as células e posteriormente, infectando células vizinhas. Bradizoítos se dividem lentamente, transformam a membrana do VP em uma parede cística rica em carboidratos e se mantêm isolados no interior da célula por longos períodos (Guimarães e cols., 2003). Essas variações morfológicas refletem diferenças

metabólicas entre os dois estágios (Smith, 1995; Zhang e Smith, 1995, Speer e Dubey, 2005).

O *Toxoplasma* apresenta um ciclo de vida complexo com dois mecanismos de transmissão: (i) ingestão de oocistos produzidos durante o ciclo enteroepitelial do parasito em gatos e, (ii) através do estágio de cisto tecidual presente na fase crônica da infecção dos hospedeiros intermediários (Ferguson, 2004).

Este complexo ciclo de vida resulta em 4 estágios infecciosos: taquizoíta, bradizoíta, merozoíta e esporozoíta, com papéis biológicos distintos. Formas taquizoítas e merozoítas proliferam dentro de um hospedeiro, aumentando a densidade de parasitos. A diferença entre eles é que os taquizoítos passam por uma proliferação indiscriminada em todas células hospedeira nucleadas e se disseminam para todos os tecidos do corpo, enquanto a proliferação dos merozoítos se limita a poucas gerações (2-4) e exclusivamente no interior de enterócitos do intestino delgado do gato (Ferguson, 2004). Além disso, a depender do estado do sistema imune do hospedeiro, taquizoítos podem sofrer diferenciação para bradizoítos, enquanto os merozoítos darão origem aos estágios sexuais -microgametócitos e macrogametócitos. Bradizoítos e esporozoítos têm em comum a transmissão da infecção entre hospedeiros, garantindo assim a sobrevivência ao rigor do ambiente externo e/ou no trato digestivo de um novo hospedeiro.

No curso da evolução, *T. gondii* desenvolveu várias rotas potenciais de transmissão (Esquema 3). No entanto, estes estudos nas últimas três décadas não elucidaram qual (ou quais) a mais importante do ponto de vista epidemiológico. A transmissão do *T. gondii* em humanos ocorre principalmente por: (i) exposição seguida de ingestão acidental de oocistos esporulados, (através de água e/ou solo contaminados com fezes de gatos), (ii) ingestão de carne crua ou mal passada contendo cistos de *Toxoplasma* e (iii) infecção transplacentária (Lopez e cols., 2000). A disseminação da toxoplasmose pode ocorrer também por transplante de órgãos ou medula óssea, pela doação de um órgão infectado com o parasito a um receptor susceptível, ou pela reativação de uma infecção latente no próprio transplantado, devido a tratamento imunossupressor (Jackson e Hutchison, 1989; Luft e cols., 1987; Ho-Yen e cols., 1992).



(Moura, 2008)

Esquema 3. Ciclo de vida do *T. gondii* mostrando as vias de transmissão entre os hospedeiros intermediários e definitivos.

Estudos que indicam que as infecções transmitidas pela ingestão de oocistos são mais graves que as induzidas por infecção por cisto (Benenson e cols., 1982; Dubey e Beattie, 1988; Smith, 1993; Hill e Dubey, 2002). Atualmente não há testes que possam discriminar entre ingestão de oocistos ou de cistos teciduais como fonte de infecção, sendo as evidências da rota de infecção conseguidas por inspeções epidemiológicas (Bahia-Oliveira, 2003).

3. Toxoplasmose em humanos e tratamento

T. gondii é o protozoário mais frequentemente encontrado em infecções oportunistas, sendo especialmente importante em duas situações: durante a gravidez podendo causar manifestações severas neurológicas e oftalmológicas no feto, quando adquirida no primeiro trimestre da gestação, e em pacientes imunocomprometidos, como HIV positivos ou em tratamento pré-transplante de órgãos (revisto em Joiner & Dubremetz, 1993; Sarciron & Gherardi, 2000).

A toxoplasmose se caracteriza por uma fase aguda, seguida por uma fase crônica quando os parasitos estão presentes em cistos teciduais, predominantemente localizados no cérebro e na musculatura. Estes cistos podem transmitir a infecção para outros hospedeiros intermediários ou gatos quando ingeridos (por carnivorismo). O maior problema no tratamento da toxoplasmose é que enquanto as drogas utilizadas podem eliminar taquizoítos, elas têm pouco efeito sobre bradizoítos, que são mantidos como fonte recrudescente da infecção (Luft e Remington, 1992; Montoya & Liesenfeld, 2004). Como resultado, a terapia com drogas é mantida obrigatoriamente durante toda a vida do paciente, o que traz grandes inconvenientes devido à toxicidade da associação da sulfadiazina com a pirimetamina, associada ao uso prolongado das drogas.

A infecção pelo *T. gondii* adquirida durante a gravidez pode causar danos intra-uterinos e, atravessando a placenta, os parasitos podem infectar o feto levando à fase aguda da doença (Foulon e cols., 1999; Ferguson, 2002; 2004). Apesar das conseqüências devastadoras da toxoplasmose congênita serem bem conhecidas como parte da síndrome do TORCH (acrônimo referente à infecção de um feto em desenvolvimento ou recém nascido por qualquer grupo de agente infeccioso, que apresente toxoplasmose, sífilis, rubéola, citomegalovirus e herpes) muitos aspectos da toxoplasmose congênita continuam controversos, por conta de dados incompletos quanto à prevalência da doença e ao impacto do tratamento (Kim, 2006).

Muitos estudos focam a toxoplasmose congênita em humanos, como resultado da transmissão vertical do parasito durante a gravidez. No entanto, pouco se sabe sobre a relativa importância deste tipo de transmissão bem como sobre os reservatórios do parasito na natureza (Tenter e cols., 2000; Jones e cols., 2001).

Um fato interessante é que, estudos epidemiológicos recentes indicam que agentes infecciosos podem contribuir para alguns casos de esquizofrenia (Torrey & Yolken, 2003). Infecções com *Toxoplasma* em animais geraram alteração em funções neurotransmissoras e comportamentais (Webster, 2007). Em humanos, a infecção aguda pode produzir sintomas psicóticos similares aos apresentados por pessoas esquizofrênicas. Além disso, ratos infectados por *Toxoplasma* parecem ser menos neofóbicos (medo persistente e anormal de qualquer coisa nova), levando a diminuição da sua aversão natural ao odor de gatos (Berdoy e cols., 2000). De fato, estudos realizados em 1979, demonstraram que o *Toxoplasma* prejudica o

aprendizado e a memória em camundongos, além de alterar mudanças no comportamento nestes animais e em ratos (Witting, 1979; Webster, 2007).

Nos últimos anos houve um progresso considerável em relação ao desenvolvimento de vacinas contra toxoplasmose, baseada na cepa viva atenuada S48, de uso veterinário (Stanley e cols., 2004). Vacinas são caras, causam efeitos colaterais e tem curto prazo de validade. Sendo vacinas preparadas a partir de organismos vivos, elas podem sofrer reversão para cepas patogênicas e, portanto não são aplicáveis a humanos. Além disso, os cistos não são estruturas estáticas; eles regularmente se rompem ou rompem as células hospedeiras liberando parasitos que reinvaem outras células (Dubey, 1997; Dubey e cols., 1997) e podem dar início a uma resposta inflamatória, resultando na formação de nódulos gliais no cérebro do hospedeiro (Weiss e Kim, 2000).

Alguns experimentos têm demonstrado que vacinas de DNA, que se baseiam na injeção de um plasmídeo de DNA no hospedeiro, passando assim as células a produzir a proteína codificada, poderão vir a ser utilizadas em humanos de (metodologia relativamente nova e que envolve a). Este tipo de vacina induz resposta imune humoral e celular em modelos murinos (Długońska e cols., 2007; Menzies e cols., 2008). Imunização de camundongos com plasmídeo codificando o gene SAG1 (Pit SAG1) levou a uma proteção de 80-100% (Nielsen e cols., 1999). As próximas vacinas de DNA deverão considerar a regulação estágio-específica da imunidade contra o *Toxoplasma* para prevenir e/ou reduzir a formação de cistos nos hospedeiros intermediários (revisto por Boophale, 2003).

4. *T. gondii* e a célula hospedeira: invasão e formação do vacúolo parasitóforo

Patógenos obrigatoriamente intracelulares permanecem confinados num nicho (vacúolo parasitóforo) dentro da célula hospedeira, que lhes assegura fonte de nutrientes e proteção, evitando contato com o sistema imune do hospedeiro. (Coppens e cols., 2006).

Esta situação enigmática de viver em um vacúolo que não é interceptado pelo sistema endocítico da célula hospedeira é a realidade do *T. gondii*. Após a invasão, o parasito exclui ativamente uma série de proteínas da membrana da célula hospedeira, inserindo proteína secretadas pelas róptrias e pelos micronemas formando uma membrana vacuolar híbrida (Joiner and Roos, 2002).

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

As etapas de adesão e invasão na célula hospedeira são estratégias cruciais para o *T. gondii* estabelecer a infecção. A penetração do parasito requer que seu pólo anterior (conóide) entre em contato com a superfície da célula hospedeira para desencadear a invaginação da membrana celular. A invasão (15 - 17 segundos) acontece de uma maneira muito mais rápida que a fagocitose (120 segundos), o que sugere participação ativa do parasito neste processo (Nichols e cols., 1981). O processo de entrada começa com o deslizamento do parasito, que utiliza uma adesão reversível para migrar por sobre a superfície da membrana plasmática, estabelecendo assim uma íntima associação com a célula hospedeira (Carruthers e Sibley, 1997; Mordue e cols., 1999; Alexander e cols., 2005).

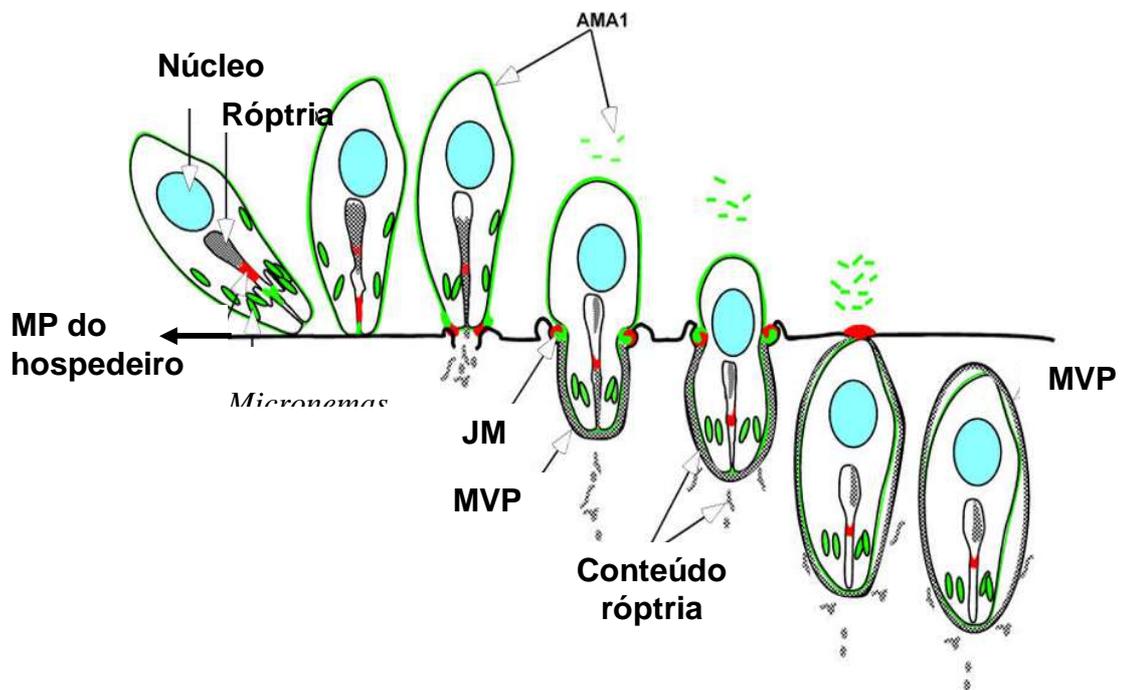
As proteínas adesivas dos micronemas em *T. gondii* (Wan e cols., 1997) em conjunto com outras proteínas, formam complexos adesivos que contém diversas moléculas semelhantes às integrinas, EGF, trombospondinas e lectinas que reconhecem receptores na superfície de diversas células, como heparan sulfato, proteoglicanas e lamininas (revisto em Tuckwell e Hamphries, 1993 e Haas e Plow, 1994). Cada complexo possui pelo menos uma proteína capaz de se ligar a receptores da célula alvo. Parte a destes complexos funcionaria na movimentação do parasito através das barreiras teciduais, enquanto outros estariam envolvidos na penetração dentro da célula hospedeira, possibilitando o reconhecimento pelo parasito de uma variedade maior de receptores e amplificando assim sua gama de hospedeiros (Carruthers, 2002).

Alexander e cols. (2005) descreveram a secreção coordenada das róptrias e micronemas durante o processo de invasão, identificando um complexo de quatro proteínas: TgAMA1, RON2, RON4 e a Ts4705. Pelo menos duas destas proteínas, a TgAMA1 e a RON4, interagem no processo de entrada, localizando-se em uma constricção denominada junção móvel (JM), uma estrutura em forma de anel, onde as

membranas do parasito e do hospedeiro ficam em íntimo contato (Alexander e cols., 2005) (Esquema 4).

O modelo mais aceito é que o parasito entre em contato com o citoesqueleto da célula hospedeira por esta JM, excluindo proteínas da membrana plasmática da mesma e dando início à formação da membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) (Mordue e cols., 1999; revisto em Boothroyd e Dubremetz, 2008).

A única circunstância em que as róptrias liberam seu conteúdo é durante o processo de invasão da célula hospedeira. Ainda não se sabe o que dispara tal secreção, mas evidentemente este processo é dependente de um reconhecimento direto entre a região apical do parasito e moléculas da célula hospedeira. Essas proteínas, uma vez secretadas, apresentam diversos destinos como: (i) localização na JM ou (ii) formação de vesículas no lúmen do VP.



(Modificado por Gomes (2006) de Alexander e cols., 2005)

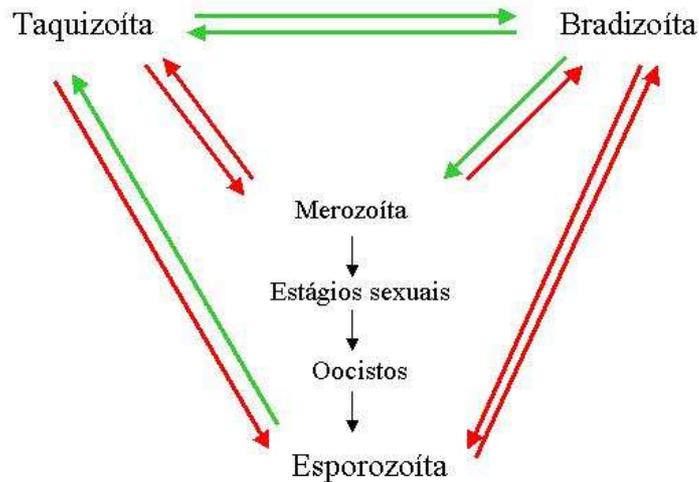
Esquema 4: Representação esquemática da invasão do *Toxoplasma*: destaque para a representação da junção móvel (JM) e da membrana do vacúolo parasitóforo (MVP). A proteína secretada pelos micronemas TgAMA1 (verde) é liberada na superfície da célula hospedeira, estabelecendo uma forte associação com a sua MP juntamente com a secreção da RON4 (vermelho). As RON4 constituintes das róptrias são detectáveis no vacúolo inicial já no interior da célula hospedeira. JM é então estabelecida e os micronemas cessam a secreção. As RON4 migram para a porção final posterior do parasito sob a forma de anel, juntamente com a constrição da JM e somente elas são encontradas no "ponto final" do estabelecimento da junção entre as membranas do vacúolo parasitóforo e da célula hospedeira.

5. Tropismo celular e estágio conversão do *Toxoplasma*

O *T. gondii* é reconhecido como um dos parasitos oportunistas mais comuns do sistema nervoso e das fibras musculares esqueléticas em indivíduos contaminados pelo vírus HIV (Luft & Remington, 1992; Gherardi e cols., 1992; Biggs e cols., 1995). Alguns autores consideram o *Toxoplasma* como um parasito neurotrófico, uma vez que encefalites severas são freqüentemente um sintoma clínico da doença (Dubey, 1997). No entanto, até o momento o tropismo celular dos taquizoítos não foi bem caracterizado *in vivo* (revisto em Boothroyd e Dubremetz, 2008). Por outro lado, em carneiros, ovelhas, porcos, cavalos e vacas, cistos teciduais são encontrados com mais freqüência na musculatura esquelética do que no tecido nervoso (Dubey, 1980b, 1982, 1983, 1984, 1985; Thorne & Sharma, 1980; Dubey, Murrel & Fayer, 1984; Dubey e cols., 1986). É provável que exista uma predileção por parte do parasito em formar cistos no músculo estriado (Guimarães e cols., 2008) e no sistema nervoso central, sendo estas células alvo na fase crônica da doença (Dubey e cols., 1998; Lüder e cols., 1999).

A diferenciação é um processo fundamental em organismos vivos, sendo essencial para organismos multicelulares e também comum em unicelulares, sendo neste caso um fenômeno temporal sempre associado a alterações no meio ambiente e envolvendo a passagem de um estágio para outro. No caso de parasitos protozoários, esta diferenciação é freqüentemente um processo obrigatório que distingue estágios no ciclo de vida, requerido para multiplicação, transmissão entre hospedeiros e sobrevivência nos mesmos (Dziersszinski, 2004).

A diferenciação das diversas formas infectivas durante o ciclo de vida do *Toxoplasma* está representada no Esquema 5. A diferenciação de formas taquizoítas para bradizoítas é fundamental para o desenvolvimento de cistos teciduais e o encistamento é um passo chave, que permite a manutenção do parasito dentro do hospedeiro por um longo período (Frenkel, 1973; Weiss e Kim, 2000).



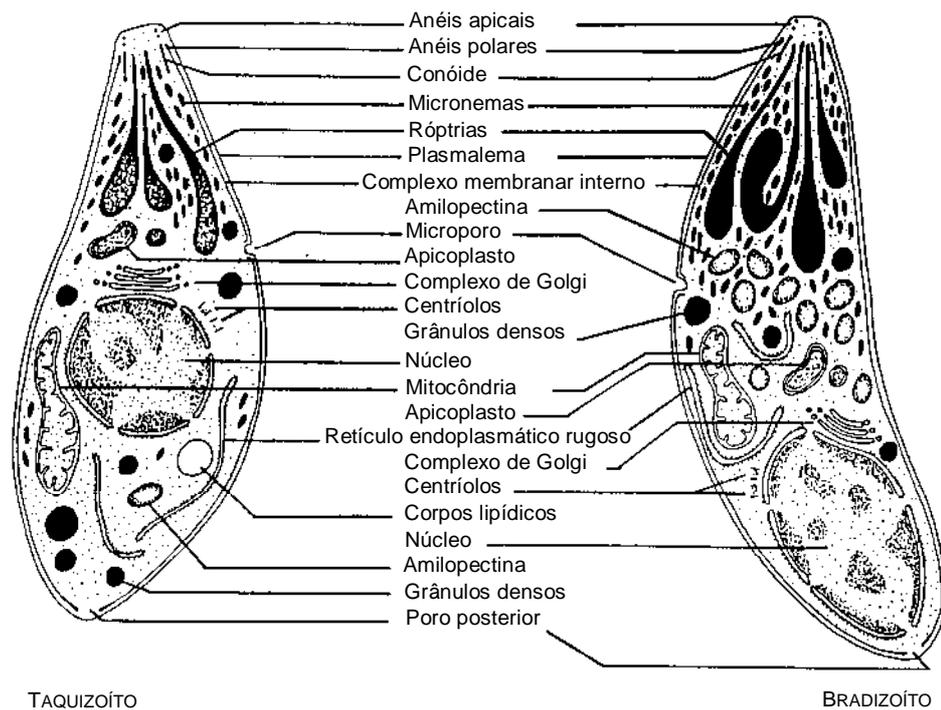
(Adaptado de Ferguson, 2004)

Esquema 5. Linhas possíveis de desenvolvimento e estágio diferenciação que podem ocorrer entre as diversas formas infectivas durante o ciclo de vida do *Toxoplasma*. As setas verdes mostram as possíveis conversões, enquanto as setas em vermelho, direções de conversões que não parecem ser possíveis.

Pouco se sabe sobre os mecanismos que levam ao encistamento tecidual ou sua reativação, apesar dos cistos serem de grande importância na fisiopatologia da toxoplasmose. Estudos *in vitro* têm sido desenvolvidos demonstrando a cistogênese em culturas celulares (Hoff e cols., 1977; Jones e cols., 1986; Dardé e cols., 1989; Lindsay e cols., 1991; McHugh e cols., 1993; Lindsay e cols., 1993; Ricard e cols., 1999; Guimarães, 2002). A maioria destes estudos tem sido realizada com linhagens celulares e utilizando condições de estresse que objetivam mimetizar a resposta imune do hospedeiro (Bohne, 1996), como pH alcalino, drogas, altas temperaturas (Bohne e cols., 1993, 1994, Soête e cols., 1994; Gross & Pohl, 1996, Ferreira-Da-Silva e cols., 2008) e possibilitam a análise da interconversão entre bradizoítos e taquizoítos (Soête e cols., 1993; Bohne e cols., 1994; Soête e cols., 1996; Lane cols., 1996; Guimarães e cols., 2008).

Há consideráveis mudanças no *Toxoplasma* durante o processo de estágio diferenciação, referente a: (i) alterações na superfície do parasito, (ii) alterações no metabolismo do parasito e (iii) indução de genes associados à resposta de estresse

(revisto em Bohne e cols., 1999). Os antígenos de superfície SAG1 e SAG2 desaparecem ao longo da diferenciação, não sendo muito clara a função biológica destas alterações na expressão de moléculas de superfície do parasito. A mudança da forma replicativa rápida dos taquizoítos, que requer alto consumo de energia, para bradizoítos que se multiplicam lentamente também é acompanhada por uma alteração no metabolismo do parasito, ocorrendo um armazenamento de energia sob forma de grânulos de amilopectina, numerosos em bradizoítos e muitas vezes ausentes em taquizoítos (revisto em Bohne e cols., 1999).



(Reproduzido e adaptado de Dubey e cols., 1998)

Esquema 6: **Comparação esquemática ultra-estrutural das formas taquizoítas (esquerda) e bradizoítas (direita).** Taquizoítos apresentam núcleo mais centralizado, róptrias esponjosas e pequeno número, ou mesmo ausência, de grânulos de amilopectina. Por outro lado, bradizoítos apresentam núcleo basal, róptrias mais eletrondensas e um grande número de grânulos de amilopectina.

6. A célula muscular esquelética

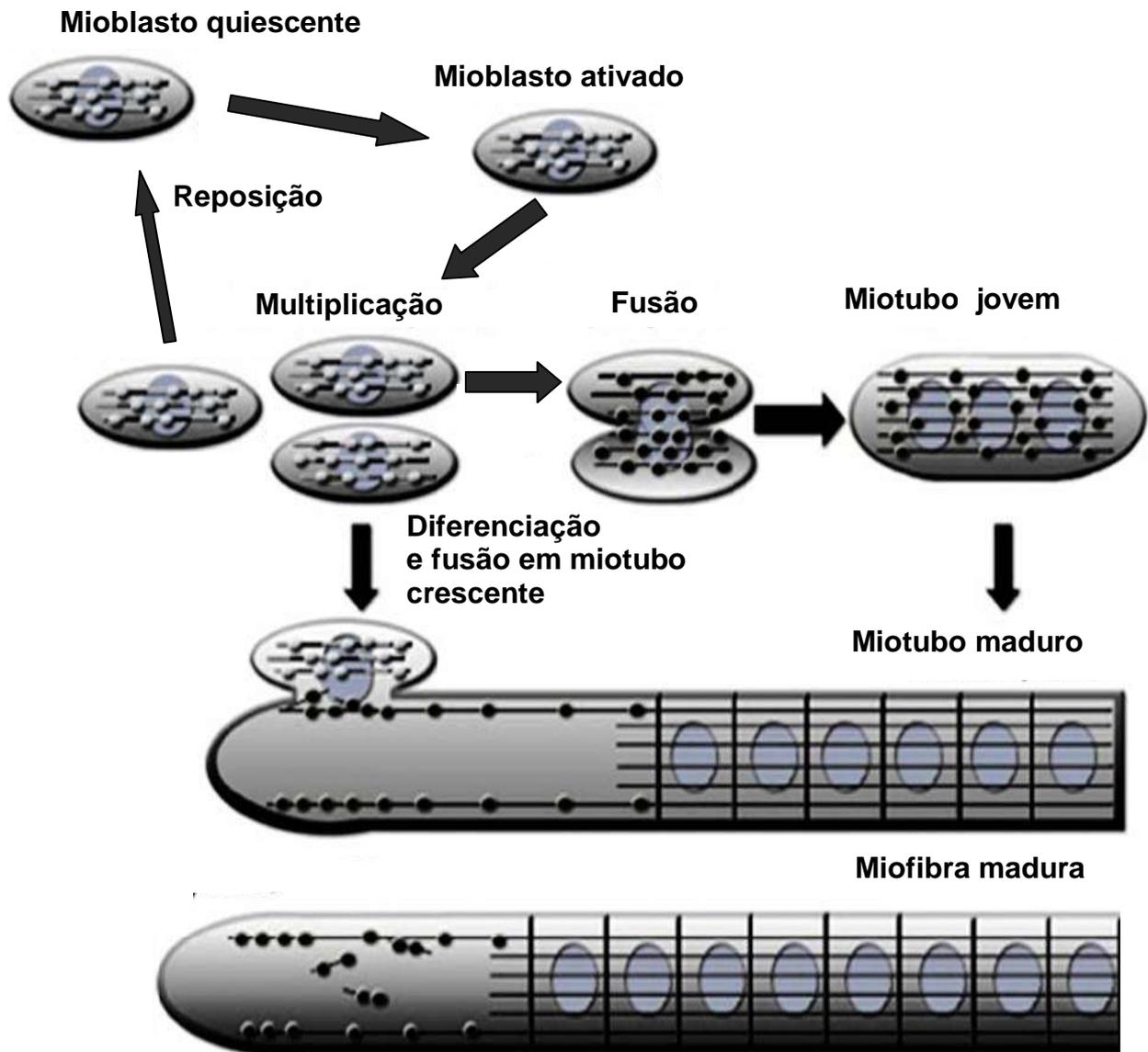
6.1. Biologia celular e molecular da miogênese

Os músculos esqueléticos são órgãos especializados na produção de força e que consistem em uma população heterogênea de células multinucleadas e miofibras estriadas envolvidas por um tecido conectivo (Willians e cols., 1989, Tortora e cols., 2003). As fibras musculares esqueléticas são células altamente diferenciadas, formadas em várias regiões do corpo, tendo como precursor celular os mioblastos (Buckingham, 1994). Estes se fundem e formam longos e multinucleados miotubos, que se organizam em miofibras (Esquema 7) produzindo proteínas músculo-específicas, envolvidas com a organização de organelas e da membrana plasmática dos mioblastos (Lu e cols., 2001). O músculo esquelético é altamente vascularizado com o objetivo de fornecer os nutrientes essenciais para as funções musculares (revisto em Sophie e cols., 2003).

Um grupo de fatores transcricionais, os chamados fatores reguladores miogênicos (MRFs), são críticos para a determinação e diferenciação terminal do músculo esquelético. Os MRFs são a MyoD1 (diferenciação miogênica 1), Myf5 (fator miogênico 5), miogenina e MRF4 (também conhecido como *Myf6*, fator miogênico 6), que juntos com proteínas da família MEF2 coordenam a expressão de genes durante a miogênese. Cada um desses genes regula a expressão do outro. Em aves, o primeiro gene a ser expresso em células precursoras é o *myoD*, seguida da expressão de *myf-5*. No entanto, em mamíferos, ocorre o contrário, sendo a expressão de *myf-5* anterior a expressão de *myoD* (Pownall e cols., 2002; revisto em Berkes e Tapscott, 2005). Estes fatores reguladores juntamente com outros, denominados estimuladores (fatores de crescimento), ativam a migração celular e o programa de diferenciação (Esquema 5) através da indução da transcrição de genes músculo-específicos, tanto regulatórios quanto estruturais (Buckingham e cols., 2003).

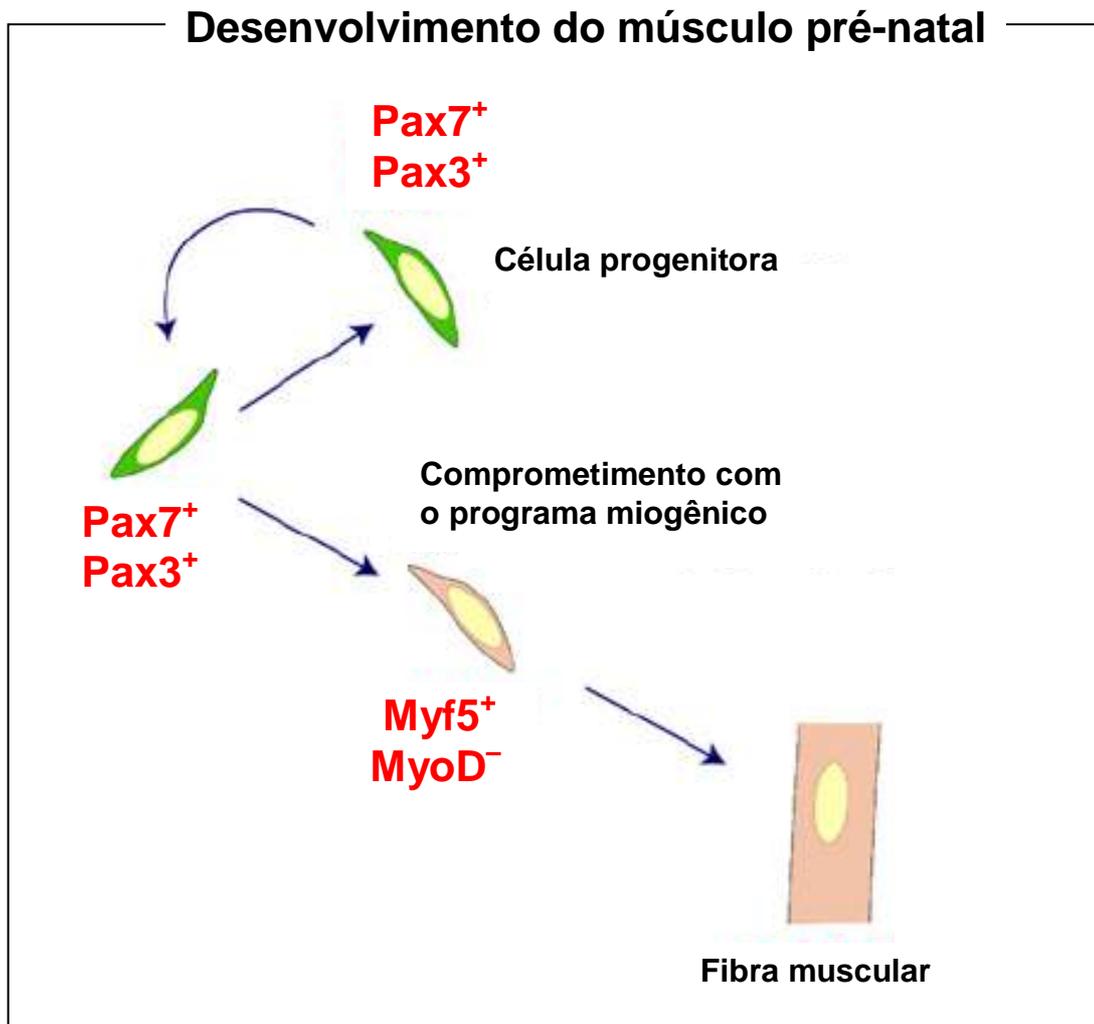
A expressão de MyoD e Myf5 é uma etapa fundamental e resulta no comprometimento de células do somito em linhagens miogênicas, enquanto a

miogenina desempenha importante papel na diferenciação de mioblastos (revisado por Berkes e Tapscott, 2005) (Esquema 8).



Modificado de Sanger e cols., 2006.

Esquema 7: Miogênese: Desenvolvimento inicial do músculo esquelético a partir de células mioblastos que após ativação, multiplicam-se e fusionam-se dando origem a miotubos jovens. Miócitos (mioblastos aptos à fusão) continuam se fusionando ao miotubo inicial, formando miotubos maduros e posteriormente miofibras.



(Modificado de Buckingham, 2007)

Esquema 8: Representação esquemática da miogênese em embriões. Direcionamento de progenitores da célula muscular esquelética no programa miogênico com expressão de Myf5 e MyoD, genes de determinação miogênica.

6.2. Cultura Primária de Células Musculares Esqueléticas

O cultivo primário de células musculares esqueléticas em monocamadas foi iniciado no início da década de 60 utilizando embriões de pinto (Konigsberg, 1963; revisto em Yaffe, 1973). Células musculares esqueléticas podem ser cultivadas a partir de uma grande variedade de espécies de insetos, aves e de mamíferos. Culturas primárias de tecidos embrionários são obtidas por dissociações mecânicas, enzimáticas ou pela conjugação de ambas as técnicas (Konigsberg e cols., 1978) e

cultivadas em meio suplementado com soro (soro de cavalo, fetal bovino, extrato embrionário). Esses agentes são indutores da atividade mitótica, facilitam a adesão celular às superfícies e são estimuladores da fusão de membranas (De Haan, 1965; De Lucca, 1966). A adição de cálcio no meio de cultura é fundamental para o início do processo de fusão celular (Shainberg e cols., 1969).

Durante a dissociação enzimática do tecido muscular, são isolados pelo menos três tipos celulares mononucleados: fibroblastos, mioblastos e miofibroblastos. Algumas manobras são utilizadas ao longo do cultivo objetivando enriquecer a população de mioblastos e diminuir a de fibroblastos. A seqüência de eventos morfofuncionais característicos da miogênese esquelética é: mioblastos, mioblastos competentes para fusão (miócitos), miotubos jovens, miotubos maduros e miofibra (revisto em Inestrosa, 1982). O músculo diferenciado é caracterizado pela presença de células multinucleadas não divisíveis (miotubos e miofibras) formadas pela fusão dos mioblastos. Tem sido demonstrado que a fusão é dependente da composição do meio e da densidade celular (Linkhart e cols., 1981), ocorrendo num período de 5-6 h após o plaqueamento e somente entre os mioblastos que já tenham passado pelas mudanças específicas do desenvolvimento, *in vitro*.

Linhagens celulares de mioblastos têm sido obtidas a partir de tecido muscular de rato (L6 e L8) e camundongo (C12). Esses mioblastos, após um período de multiplicação *in vitro* requerem uma mudança de concentração de soro em seu meio e para que ocorra o disparo da diferenciação miogênica e conseqüente formação de miotubos (Yaffe, 1968; Yaffe e Saxel, 1977).

A escolha do modelo de células musculares esqueléticas (CME), proposto por nosso grupo durante o estudo da interação do *T. gondii*-célula hospedeira (Monteiro-Leal e cols., 1998; Andrade e cols., 1998; Andrade e cols., 1999; Barbosa e cols., 1998, 1999, 2000; Andrade e cols., 2001; Barbosa e cols., 2001; Guimarães, 2002; Rodrigues e cols., 2001; Barbosa e cols., 2005; Guimarães e cols., 2008) e utilizado na presente tese, baseia-se em dados iniciais *in vivo*, os quais demonstraram que a cistogênese é prevalente nos tecidos neurais e musculares, tanto cardíaco quanto esquelético (Jacobs, 1967; Mehlhorn e Frenkel, 1980; Dubey, 1988; Frenkel, 1990). Além disso, esta escolha se justifica: (i) pela importância das CME como uma das células alvo, onde o parasito se aloja durante a fase crônica da doença, havendo evidências do isolamento de cistos em necrópsias de músculo esquelético em humanos (Remington & Cavanaugh, 1965), (ii) pelos relatos de toxoplasmose muscular em pacientes com HIV demonstrando por técnicas de

imunocitoquímica e microscopia eletrônica a presença do parasito nesse tecido (Gherardi e cols., 1992); (iii) por considerarmos que a caracterização e a identificação de moléculas presentes na superfície de células transformadas e seu comportamento frente ao parasito, podem não refletir as mesmas interações moleculares que ocorrem naturalmente durante o desenvolvimento da doença, *in vivo*; (iv) pelos nossos recentes resultados, demonstrando a ocorrência de cistogênese espontânea na célula muscular esquelética, possibilitando uma análise molecular da conversão de bradizoítos e reativação de cistos, sem a interferência de agentes químicos ou físicos (Guimarães e cols., 2002; Guimarães e cols., 2008), (v) pelo músculo infectado representar uma das principais vias de transmissão da infecção nos humanos, durante a ingestão de carne crua ou mal cozida.

OBJETIVOS

II OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Estudar a conversão taquizoíta-bradizoíta durante a interação de *T. gondii* em células musculares esqueléticas e em linhagens celulares.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1. Estabelecer a miogênese de culturas primárias de CME *in vitro*, analisando a expressão gênica de proteínas músculo específico;
- 2.2. Monitorar comparativamente a conversão de taquizoítos para bradizoítos de *T. gondii* em CME e em linhagens celulares de músculo e de fibroblastos;
- 2.3. Analisar a transcrição gênica de bradizoítos durante a infecção de *T. gondii* em CME através de ensaios por qRT-PCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

III Materiais e métodos

Todos os experimentos foram executados de acordo com as Normas de Segurança estabelecidas pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da FIOCRUZ, resolução 242/99, licença sob o número 0229-04 e pelas Normas Internacionais dos cuidados na manipulação de animais e agentes infecciosos.

1. Isolamento e cultura de células musculares esqueléticas (Barbosa e cols., 2000).

Fêmeas de camundongos NMRI grávidas com 18 a 20 dias de gestação foram eutanasiadas por deslocamento cervical e em câmara mortuária contendo CO₂, seguido dos procedimentos cirúrgicos.

As fêmeas foram colocadas em posição ventral, o abdômen aberto e exposto o útero contendo os embriões que foram retirados com auxílio de pinças e tesouras estéreis e mantidos em solução de Ringer (154 mM NaCl, 56 mM KCL, 17 mM Na₂HPO₄ em solução aquosa) no gelo. Em seguida, as coxas dos embriões foram retiradas e a pele que envolvia o membro posterior, assim como o tecido ósseo e o cartilaginoso, foram separados do material muscular de interesse.

Os músculos isolados foram transferidos para uma nova placa estéril descartável contendo solução de Ringer. O tecido muscular foi fragmentado (~ 5 mm³) com auxílio de um bisturi e mantido em solução de Ringer e no gelo. Os fragmentos foram transferidos para um Erlenmeyer de 50 ml contendo Ringer e os músculos foram dissociados enzimática e mecanicamente de 5 a 7 vezes, 5 minutos cada, em solução de PBS contendo 0,05% tripsina e 0,01% EDTA. A cada dissociação, uma alíquota da solução foi monitorada ao microscópio óptico, objetivando avaliar o efeito da tripsinização sobre o tecido, o número de células isoladas, sua refringência e viabilidade celular.

A dissociação do tecido foi interrompida pela adição de 10% soro fetal bovino em meio modificado Dulbecco (DMEM) a 4°C. A solução contendo células isoladas foi centrifugada e ressuspensa em meio com 15% de soro de cavalo, 2% de soro fetal bovino, 1 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml estreptomicina. As células foram plaqueadas em garrafa de cultivo celular, incubadas por 30 min a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A seguir foi utilizado o plaqueamento seqüencial, visando diminuir o número de fibroblastos do pool final de células e enriquecer a

cultura de mioblastos. Esta manobra se baseia no fato de que os fibroblastos apresentam uma velocidade de adesão ao substrato mais rápida do que os mioblastos, facilitando então, a purificação da cultura. Após 30 min, o sobrenadante rico em mioblastos foi recolhido e centrifugado novamente e cultivado em placas. Para análise das amostras por imunofluorescência 3×10^4 mioblastos foram cultivados em placas de 24 poços, enquanto para os ensaios de extração de RNA, 10×10^4 /poço de mioblastos foram cultivados em placas de 6 poços.

Visando manter as células bem aderidas às superfícies de cultivo e a obtenção de culturas de longo termo, as superfícies plaqueadas foram previamente revestidas "overnight" com 0,5 mg/ml poli-ornitina em solução de 150 mM tampão borato de sódio, pH 8,3 e então revestidas com 15 µg/ml de laminina em PBS por pelo menos 6 horas. As culturas foram mantidas a 37°C por 4-5 dias para permitir a miogênese.

2. Manutenção e diferenciação de linhagem de mioblasto de rato (L6.C10)

A linhagem de mioblasto de rato L6.C10 foi obtida da Coleção Européia de Culturas de Células Animais (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, UK). Os mioblastos foram mantidos subconfluentes cultivando 2×10^5 células em garrafas de 75 cm³ em DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos.

Quatro diferentes meios foram testados para analisar a capacidade de indução miogênica da linhagem de mioblastos (processo de fusão e formação de miotubos): (i) DMEM; (ii) DMEM + 2% SFB; (iii) DMEM + 2% soro de cavalo e, (iv) DMEM + 10% SFB. As culturas foram analisadas ao longo do tempo, com início após as primeiras 24 h de cultivo celular até o 10º dia de plaqueamento, monitoradas ao microscópio de contraste de fase considerando-se a evolução da diferenciação miogênica. As imagens foram capturadas utilizando o programa Axion Vision 4.5 (Zeiss).

3. Cultura de linhagem de fibroblasto de camundongo (L929)

Fibroblastos de camundongo da linhagem L929 foram mantidos regularmente em placas de 6 poços e cultivados em DMEM contendo 10% SFB, 1 mM de piruvato de sódio, aminoácidos não essenciais, penicilina e estreptomicina. As células foram

plaqueadas em placas de 24 poços para realização dos ensaios de estágio-conversão.

4. Cultivo do *Toxoplasma* e infecção das células

Taquizoítos da cepa NTE avirulenta tipo II de *T. gondii* foram mantidos em células L929 como células hospedeiras. A co-cultura foi cultivada em meio RPMI contendo 1% SFB e 1% de antibiótico, e os parasitos foram coletados logo após a iniciação do processo de lise dos fibroblastos. Para infecção das células musculares e dos fibroblastos, o sobrenadante das culturas de células L929 rico em taquizoítos foi coletado e centrifugado a 35 × g por 5 min para isolar possíveis debris celulares. O sobrenadante foi então centrifugado a 1350 × g por 10 min, ressuspenso em meio DMEM suplementado com 10% SFB e 1% de estreptomicina/ penicilina.

Cultura primária de células musculares esqueléticas, cultura de linhagem de mioblasto L6.C10 e os fibroblastos foram infectados com taquizoítos de *T. gondii* numa razão parasita-célula hospedeira de 1:1 e mantidos em seus respectivos meios de cultura.

5. Ensaios de imunofluorescência

5.1. Monitoramento da diferenciação das células musculares *in vitro*

Com o objetivo de identificar proteínas músculo específicas e a formação de miotubos multinucleados ao longo do processo de diferenciação muscular *in vitro*, células musculares esqueléticas foram cultivadas em lamínulas de vidro, previamente revestidas por laminina, e fixadas por 5 minutos com uma solução de 4% paraformaldeído em 0.1 M de solução tampão cacodilato de sódio após 1, 2, 4 e 6 dias de cultivo. Em seguida, as culturas foram lavadas por 10 min em solução 50 mM NH₄Cl em PBS, pH 7,4 e permeabilizadas com 0,1 mg/ml saponina em PBS contendo 1% albumina bovina de soro (BSA) 3 vezes por 10 min. As células foram incubadas com 2 e 5 µg/ml de anticorpo anti-desmina e anti-MyoD (BD Biosciences, Heidelberg, Alemanha) por 1 h a 25°C ou então ou “o vernight” a 4°C, lavadas 3x novamente com solução de 0,1 mg/ml saponina em PBS e então incubada com anticorpo secundário Cy3. As lamínulas contendo monocamada de células musculares foram montadas em 10 µl/ml Mowiol e analisadas com um microscópio

confocal a laser (Modelo TCS SP2, Leica, Heidelberg). Controles negativos foram realizados para cada um dos marcadores.

5.2. Monitoramento da diferenciação dos parasitos *in vitro*

Visando acompanhar a estágio conversão de taquizoítos em bradizoítos ao longo de uma cinética, células infectadas com *T. gondii* foram fixadas com uma solução de 4% paraformaldeído em 0,1 M de solução tampão cacodilato de sódio. As células foram lavadas por 10 min em solução de 50 mM NH₄Cl em PBS, pH 7,4 e então permeabilizadas por 1 h em solução de PBS contendo 0,1 mg/ml saponina e 1% albumina de soro bovino (BSA). Após esta etapa, as células foram incubadas simultaneamente com o anticorpo monoclonal CC2 produzido em rato, que reconhece bradizoítos (Gross e cols., 1995) e com um anticorpo policlonal anti-*Toxoplasma* feito em coelho, por 1 hora. Em seguida as células foram lavadas 3x novamente com solução de 0,1 mg/ml saponina em PBS e incubadas simultaneamente com o anticorpo secundário Cy2 anti-rato e Cy3 anti-coelho. As monocamadas de células foram montadas em Mowiol, analisadas por um microscópio confocal de varredura a laser e o percentual de vacúolos contendo bradizoítos foi determinado contando-se aleatoriamente 100 vacúolos parasitóforos por lamínula em um microscópio de fluorescência (Modelo DM R, Leica, Heidelberg).

6. Análises por PCR quantitativo e semiquantitativo (q RT-PCR)

6.1. Da expressão genes-músculo específicos

Com o objetivo de determinar a diferenciação miogênica das células musculares esqueléticas *in vitro*, o RNA de total de culturas primárias de músculo esquelético foi isolado após 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10 dias de cultivo. Dez nanogramas de cDNA por amostra foram usados como “template” para realização do PCR semi quantitativo (Termociclador modelo T3, Biometra, Göttingen), utilizando os pares de primers músculo-específico para Myf-5 e MyoD, e β actina como *house keeping gene*, listados na Tabela 1. Cada produto de PCR foi misturado a um tampão de corrida (98% formamida, 10mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol e 0,05%xilenocianol), separado em gel em 1% agarose e visualizados utilizando brometo de etídio. Em todas as reações de PCR foram utilizados controle negativo, constituído por todos os reagentes presentes na reação e isento de DNA.

6.2. De genes-estágio específico do *Toxoplasma*

Para análise da expressão de genes estágio-específicos do *Toxoplasma*, RNA total foi isolado das culturas infectadas utilizando o kit GenElute Miniprep (Sigma, Deisenhofen, Alemanha). Após transcrição reversa, diluições seriadas de cDNA foram amplificadas por PCR quantitativo em tempo real em um LightCycler com SYBR Green FastStart DNA Master^{Plus} (Roche, Mannheim, Alemanha) utilizando os primers específicos de *T. gondii*, ENO2 e ENO1, e α tubulina como *house keeping gene*. Em todas as reações de PCR foram utilizados controle negativo, constituído por todos os reagentes presentes na reação e isento de DNA.

Os dados foram analisados utilizando-se o programa REST-MCS 2006 (Pfaffl e cols., 2002). A expressão relativa dos genes foi calculada entre as cinéticas de 4 h de infecção (controle) e 1 dia, 2, 4 e 6 dias após infecção (amostras), utilizando a seguinte fórmula matemática:

$$\text{Razão} = (E_{\text{gene alvo}})^{\Delta\text{CPalvo}(\text{controle-amostra})} / (E_{\text{gene de referência}})^{\Delta\text{CPref}(\text{controle-amostra})}$$

onde, o gene de referência foi o gene para tubulina e os genes alvos foram o ENO1 (bradizoíto específico) e o ENO2 (taquizoíto específico). ΔC é referente aos valores de “crossing point” dos tempos 1, 2, 4 e 6 dias após infecção (amostras) em relação ao tempo de 4 h (controle).

TABELA 1: Tabela de seqüências de “primers”

GENES	SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS
α tubulina forward	5'-CGCCACGGCCGCTACCTGACT-3';
α tubulina reverse	5'-TACGCGCCTTCCTCTGCACCC -3'
ENO2 forward	5'-AGCGGCGCATCCACTGGCATCTAC-3';
ENO2 reverse	5'-AACGGGACGGGCATTACCATCTTG-3';
ENO1 forward	5'-CGAGGGGTGGCTGAAAAAGTATCC-3';
ENO1 reverse	5'-CAGCGAAGGCCACGACAAG-3'.
Myf5 forward	5'-TGAGGGAACAGGTGGAGAAC-3'
Myf5 reverse	5'-AGCTGGACACGGAGCTTTTA-3'
MyoD1 forward	5'-TACCCAAGGTGGAGATCCTG-3'
MyoD1 reverse	5'-CATCATGCCATCAGAGCAGT-3'
β actina forward	5'-GATGACCCAGATCATGTTTGAGAC-3'
β actina reverse	5'-TGCTCGAAGTCTAGAGCAACATAG-3'

7. Estágio conversão do *Toxoplasma* induzido por estresse exógeno

7.1. Indução da estágio conversão por aumento do pH e ausência de CO₂

CMEs e linhagem de mioblasto de rato (L6.C10) foram cultivadas em placas de 24 poços, infectadas numa relação 1:1 célula hospedeira-parasita e mantidas em meio de diferenciação para *toxoplasma*, em meio ajustado para pH 8,1, pH 7,8 e pH 7,6 (utilizando pHmetro Modelo 766, Calimatic, Knick, Berlin). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C na ausência de CO₂ e após 24 e 48 h de interação foram fixadas por 5 minutos com uma solução de 4% paraformaldeído em 0.1 M de solução tampão cacodilato de sódio após 1, 2, 4 e 6 dias de cultivo. As culturas foram lavadas por 10 min em solução 50 mM NH₄Cl em PBS, pH 7,4 e permeabilizadas com 0,1 mg/ml saponina em PBS contendo 1% BSA 3 vezes por 10 min. Após esta etapa, as células foram incubadas simultaneamente com o anticorpo monoclonal CC2 produzido em rato, que reconhece bradizoítos (Gross e cols., 1995) e com um anticorpo policlonal anti-*Toxoplasma* feito em coelho, por 1 hora. Em seguida as células foram lavadas novamente 3 vezes com solução de 0,1 mg/ml saponina em PBS e incubadas simultaneamente com o anticorpo secundário Cy2 anti-rato e Cy3 anti-coelho, montadas em 10 µl/ml Mowiol e analisadas com um microscópio confocal a laser (Modelo TCS SP2, Leica, Heidelberg).

7.2. Indução do estágio conversão com IFN gama em presença de LPS

Para o estudo da ação de citocinas na indução da diferenciação do *Toxoplasma*, CMEs foram infectadas e mantidas em meio de cultura contendo 100U/ml IFN-gama em presença de 1 µg/ml. As culturas foram infectadas numa relação 1:1 (célula hospedeira-parasita), fixadas após 4 h, 1, 2, 4 e 6 dpi, lavadas por 10 min em solução 50 mM NH₄Cl em PBS, pH 7,4 e permeabilizadas com 0,1 mg/ml saponina em PBS contendo 1% BSA 3 vezes por 10 min. Em seguida, as células foram processadas como descrito anteriormente: incubadas simultaneamente com o anticorpo monoclonal CC2 produzido em rato, que reconhece bradizoítos (Gross e cols., 1995) e com um anticorpo policlonal anti-*Toxoplasma* feito em coelho, por 1 hora, lavadas novamente 3 vezes com solução de 0,1 mg/ml saponina em PBS e incubadas simultaneamente com o anticorpo secundário Cy2 anti-rato e Cy3 anti-coelho, montadas em 10 µl/ml Mowiol e

analizadas com um microscópio confocal a laser (Modelo TCS SP2, Leica, Heidelberg).

RESULTADOS

IV. Resultados

1. Estabelecimento da miogênese de culturas primárias de CME.

1.1. Após análise por microscopia de contraste de fase

A diferenciação miogênica de mioblastos obtidos de embriões de camundongos NMRI foi observada após o cultivo das células em meio condicionado para cultura primária de células musculares. O referido meio tem a suplementação de 15% de soro de cavalo e 2% soro fetal bovino, induzindo alterações morfológicas características da diferenciação, reveladas por microscopia de contraste de fase (Fig. 1a-b). Inicialmente (2-3 dias), observa-se a adesão das células ao substrato e um alto percentual de células bipolares, típica morfologia de mioblastos (Fig. 1a-b). Neste período é evidente a atividade proliferativa dos mioblastos (Fig. 1b). Com o aumento do número de células, após 3-4 dias há alinhamento progressivo dos mioblastos, tendo início a fusão de miócitos, com a formação de miotubos jovens contendo 2-3 núcleos (Fig. 2a). A figura 2b mostra miotubos maduros, multinucleados, de diversos tamanhos e calibres dispostos paralelamente, após 6-7 dias de cultivo. Além disso, contrações espontâneas dos sincícios foram regularmente observadas e documentadas por vídeomicroscopia.

1.2. Por microscopia de fluorescência

O monitoramento da expressão da gênica de MyoD (proteína específica do músculo) permitiu observar marcação positiva logo após 24 h de plaqueamento, estando presente no núcleo de células mononucleadas (Fig. 3a). A expressão de desmina foi visualizada em células ainda arredondadas no mesmo período de cultivo, distribuída na periferia das células e em torno do núcleo (Fig. 3b). A diferenciação miogênica plena (4-5 dias) foi observada pela presença de múltiplos miotubos maduros com 10-20 núcleos por sincício apresentando uma forte reação nos núcleos para o fator de transcrição MyoD (Fig. 3c). Culturas após 4-5 dias de plaqueamento, expressavam desmina em seu citoplasma com maior concentração nas extremidades das células e em torno do núcleo (Fig. 3d).

1.3. Monitoramento da expressão gênica de proteínas músculo específico de culturas primárias de CME por RT-PCR.

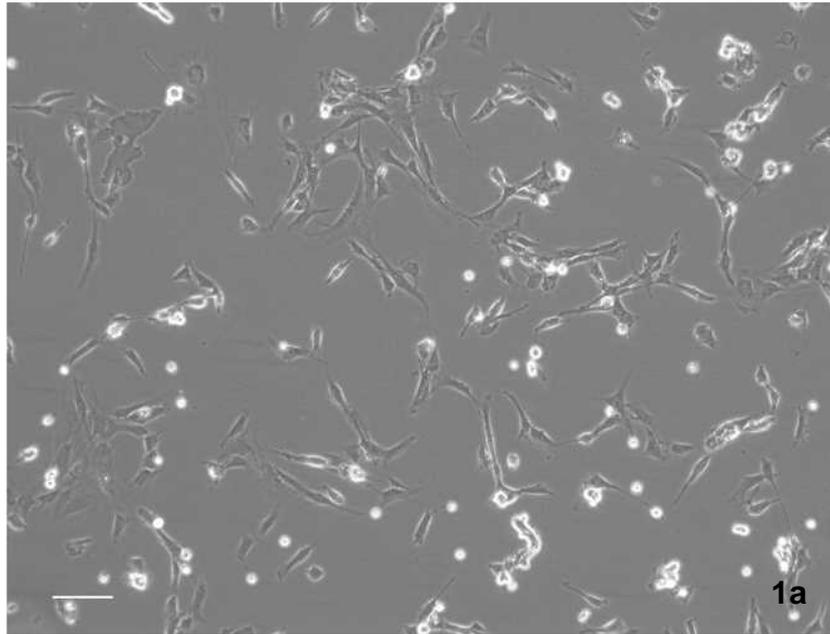
A análise por RT-PCR de RNA total de culturas primárias mostrou a cinética da expressão de genes específicos que desempenham um papel crucial na

Figura 1: Imagens de culturas de células musculares por microscopia de contraste de fase mostrando estágios iniciais da miogênese.

A: CME após 2 dias de plaqueamento nota-se o espalhamento dos mioblastos, adquirindo a forma bipolar e início de alinhamento celular. Barra: 100 μ m

B: Após 3 dias de cultivo observa-se o processo de adesão dos mioblastos ao substrato, intensa atividade proliferativa dos mioblastos e início de fusão dos miócitos. Barra: 200 μ m

2 dias



4 dias

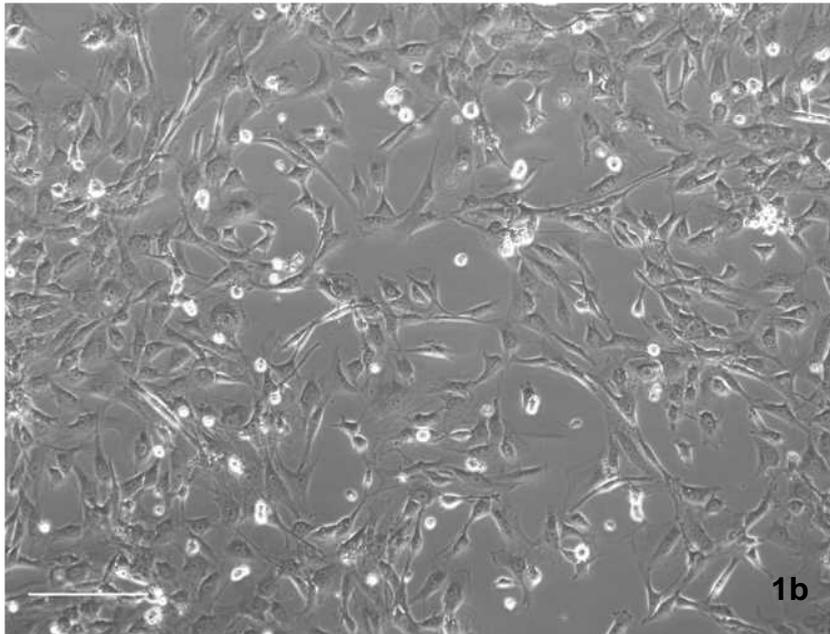


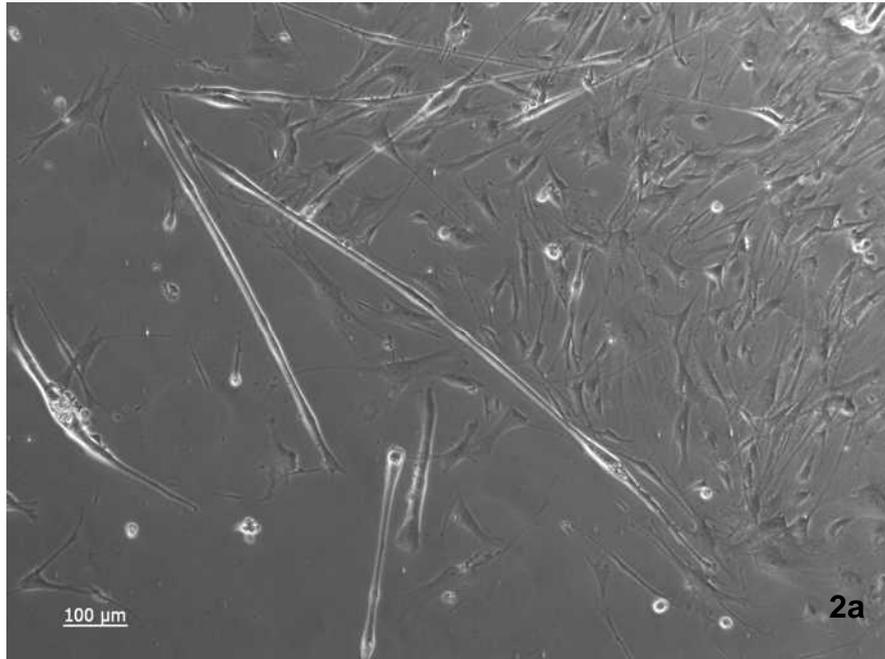
Figura 1

Figura 2: Imagens de culturas de células musculares por microscopia de contraste de fase mostrando a miogênese.

A: Diferentes aspectos da cultura mostrando no quadrante superior direito uma monocamada de células alinhadas e no quadrante central células diferenciadas formando miotubos jovens (2-3 núcleos). Barra: 100 μ m

B: Cultura muscular de longo termo, altamente diferenciada, mostrando vários feixes de miotubos paralelos e organizados. Barra: 200 μ m

5 dias



7 dias

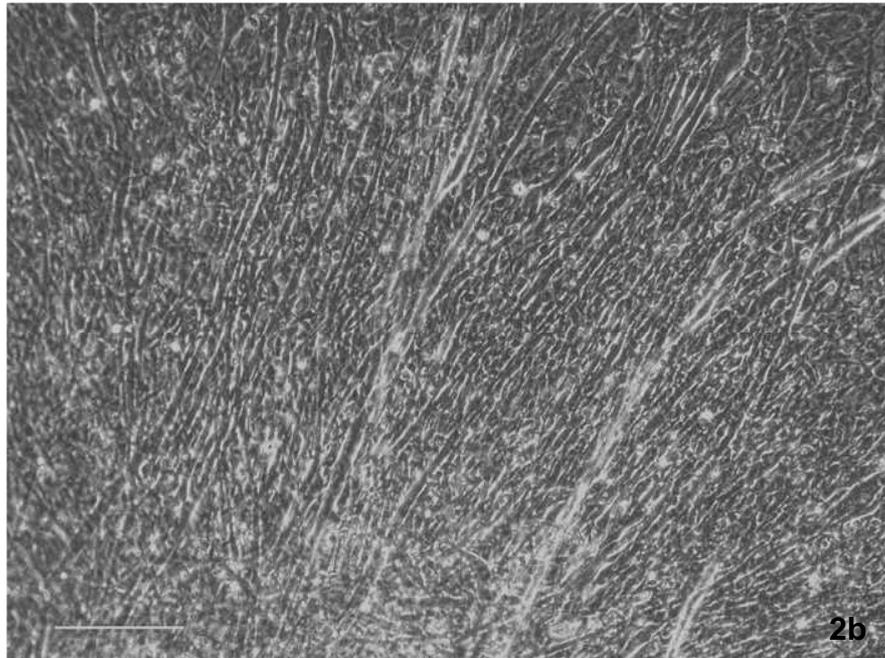


Figura 2

Figura 3: Culturas de células musculares expressando MyoD e desmina proteínas-músculo-específicas ao longo da miogênese, por microscopia confocal a laser.

A: Reação positiva para MyoD logo após 24 h de plaqueamento, estando presente no núcleo de células mononucleadas.

B: Reação positiva para desmina visualizada em células ainda arredondadas, no mesmo período de cultivo, distribuída na periferia das células e em torno do núcleo.

C: Diferenciação miogênica plena (4-5 dias) observada pela presença de múltiplos miotubos maduros com 10-20 núcleos por sincício apresentando uma forte reação nos núcleos para o fator de transcrição MyoD.

D: Expressão de desmina após 4-5 dias de plaqueamento, no citoplasma de CME, mostrando uma maior concentração nas extremidades das células e em torno do núcleo.

E: Controle negativo da reação para MyOD.

F: Controle negativo da reação para desmina.

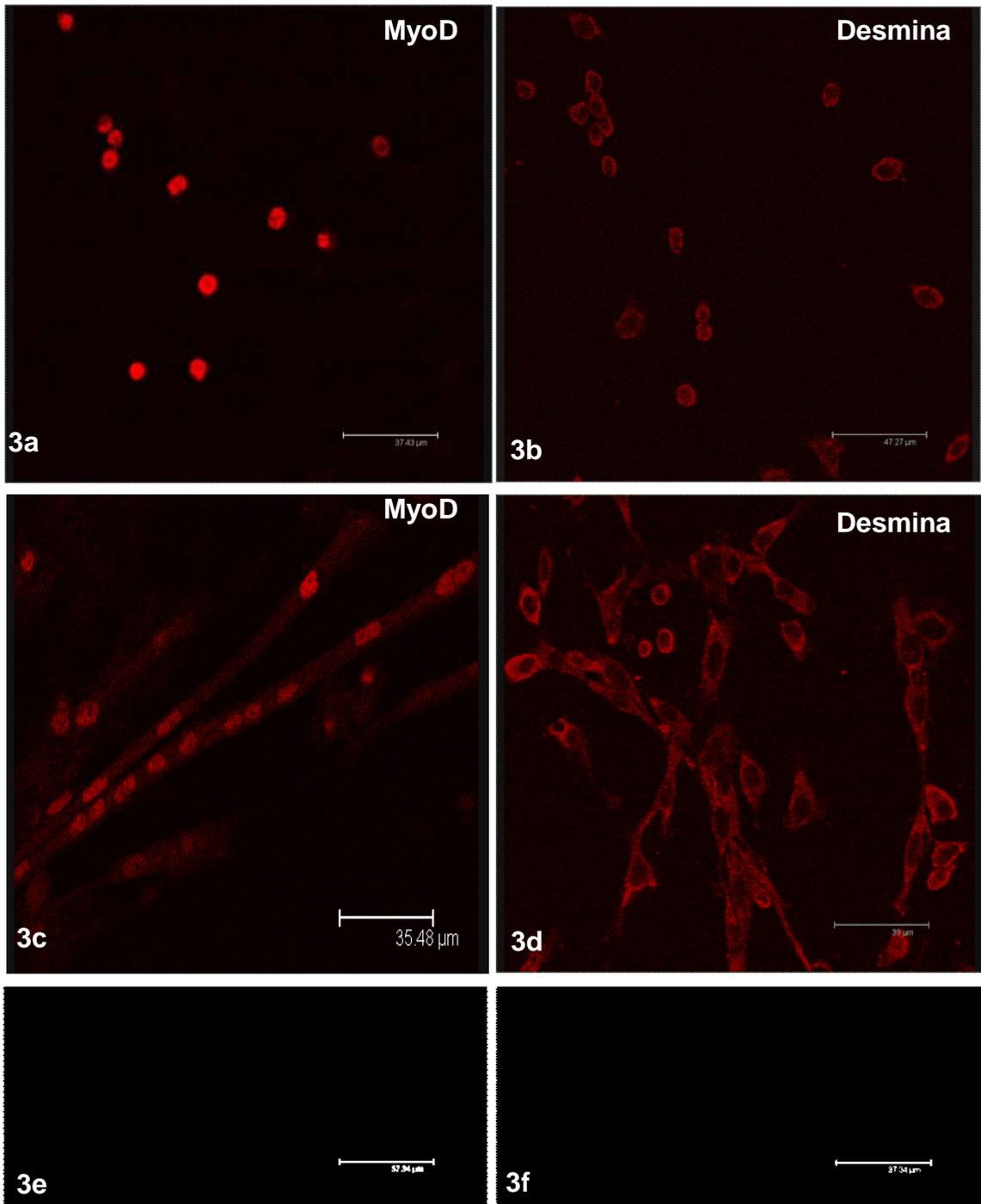


Figura 3

diferenciação de mioblastos a miotubos. Myf5 foi expresso após 2 dias de cultivo celular até 10 dias de monitoramento (Fig. 4). A expressão de MyoD foi mais acentuada entre os dias 5 e 6 dias com concomitante baixa regulação de Myf5 durante a miogenese, indicando claramente que o sistema estabelecido *in vitro* de diferenciação de células musculares esqueléticas foi estabelecido com sucesso (Fig. 4). A expressão gênica da proteína β -actina foi utilizada como padrão (controle interno) e se mostrou constante ao longo do 10 dias de análise (Fig. 4).

2. Estágio conversão taquizoíta-bradizoíta de *T. gondii* em CME

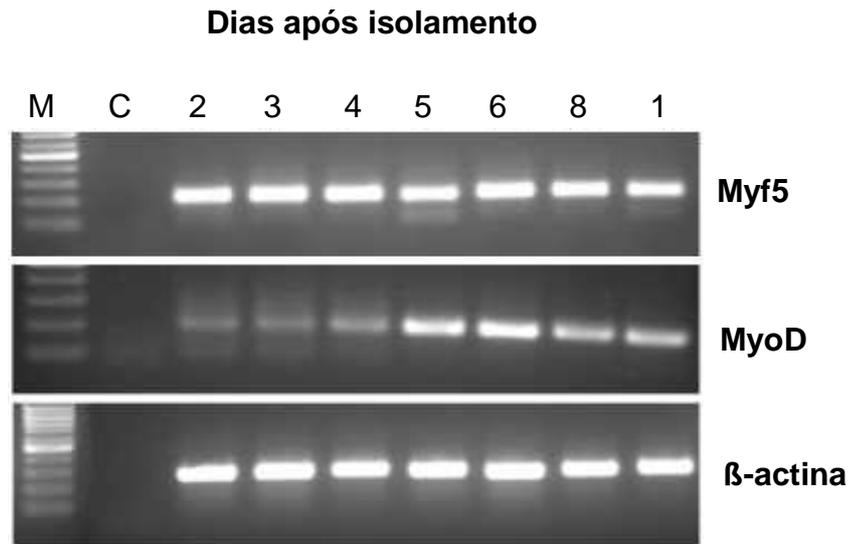
2.1 Monitoramento da conversão do *Toxoplasma* por imunofluorescência

A infecção de células musculares esqueléticas com taquizoítos de *T. gondii*, seu desenvolvimento intracelular e sua diferenciação foram monitorados a partir de 4h até o 6º dia pós-infecção. A análise foi feita por imunofluorescência indireta utilizando-se anticorpos antitoxoplasma (reconhece taquizoítos) e anti-CC2 (bradizoítos específicos). *T. gondii* se mostrou capaz de infectar as células musculares esqueléticas, a julgar pela presença de parasitos intracelulares após 4 h de infecção (Fig. 5a-c) e sua replicação foi observada ao longo das 24 h iniciais (Fig. 5d-f). No ponto inicial da infecção, os parasitos não reagiram com o anticorpo CC2 que marcam especificamente vacúolos parasitóforos contendo bradizoítos, mas não taquizoítos (Fig. 5a). A incubação das células com o anticorpo policlonal anti-*Toxoplasma* mostrou taquizoítos fortemente positivos (Fig. 5b). De forma notável, após 24 h de infecção, múltiplos vacúolos contendo *Toxoplasma* foram reativos para o anticorpo CC2 (Fig. 5d) indicando desse modo, o início da estágio conversão para bradizoíta (Fig. 5d-f).

Após 24 h de infecção foram observados vacúolos parasitóforos adjacentes a vacúolos contendo bradizoítos que não apresentavam qualquer reação e outros pouco reativos ao anticorpo anti-CC2 (Fig. 5e-f). Este fato mostrou que estágio-conversão de *T. gondii* dentro de uma mesma célula hospedeira é um processo não sincronizado. Mais surpreendentemente, uma reação heterogênea ao CC2 também foi observada dentro de um único vacúolo parasitóforo (VP) indicando que a cinética de estágio conversão também não é sincrônica no micro-ambiente da matriz vacuolar (Fig. 5g-i).

Dois dias após a infecção, a divisão dos parasitos foi mantida e vacúolos contendo 4 a 16 parasitas foram detectados dentro das células musculares

Figura 4: Análise da expressão dos genes myf5 e myoD por PCR semiquantitativo. Visualização por eletroforese dos produtos de PCR separados em gel de agarose e visualizados pelo brometo de etídeo. Expressão de marcadores específicos para célula muscular foram observados desde o 2º dia de cultivo celular até o 10º dia, indicando claramente que o sistema *in vitro* de diferenciação de células musculares esqueléticas foi estabelecido com sucesso. Atenção para a expressão de myf5 prévia a de myoD, característico do programa miogênico em mamíferos. M (marcador de 100pb) e β -actina como house keeping gene. Controle negativo (CN).



Figura

Figura 5: Estágio conversão espontânea do *T. gondii* em culturas primárias de CME na ausência de fatores externos de estresse. Imagens mostrando o desenvolvimento intracelular e a diferenciação dos parasitos, que foram monitorados desde as 4h até o 6º dia pós-infecção.

A-C: *T. gondii* se mostrou capaz de infectar as células musculares esqueléticas, a julgar pela presença de parasitos intracelulares após 4 h de infecção. Os parasitos não reagiram com o anticorpo CC2 que marcam especificamente vacúolos parasitóforos contendo bradizoítos.

D-F: Após 24 horas de infecção, múltiplos vacúolos contendo *Toxoplasma* já haviam se tornado reativos para o anticorpo CC2 (Fig. 3d), indicando início de estágio conversão para o estágio bradizoíta (Fig. 3d-f).

G-I: Vacúolo parasitóforo com reação dupla para anticorpo anti-CC2 e para *Toxoplasma* (Taquizoítos) demonstrando a presença de vacúolos mistos.

J-O: Alta reatividade ao anticorpo CC2 com a matriz do VP contendo bradizoítos dentro das células musculares esqueléticas, após 4 dias (j-l) e 6 dias (m-o).

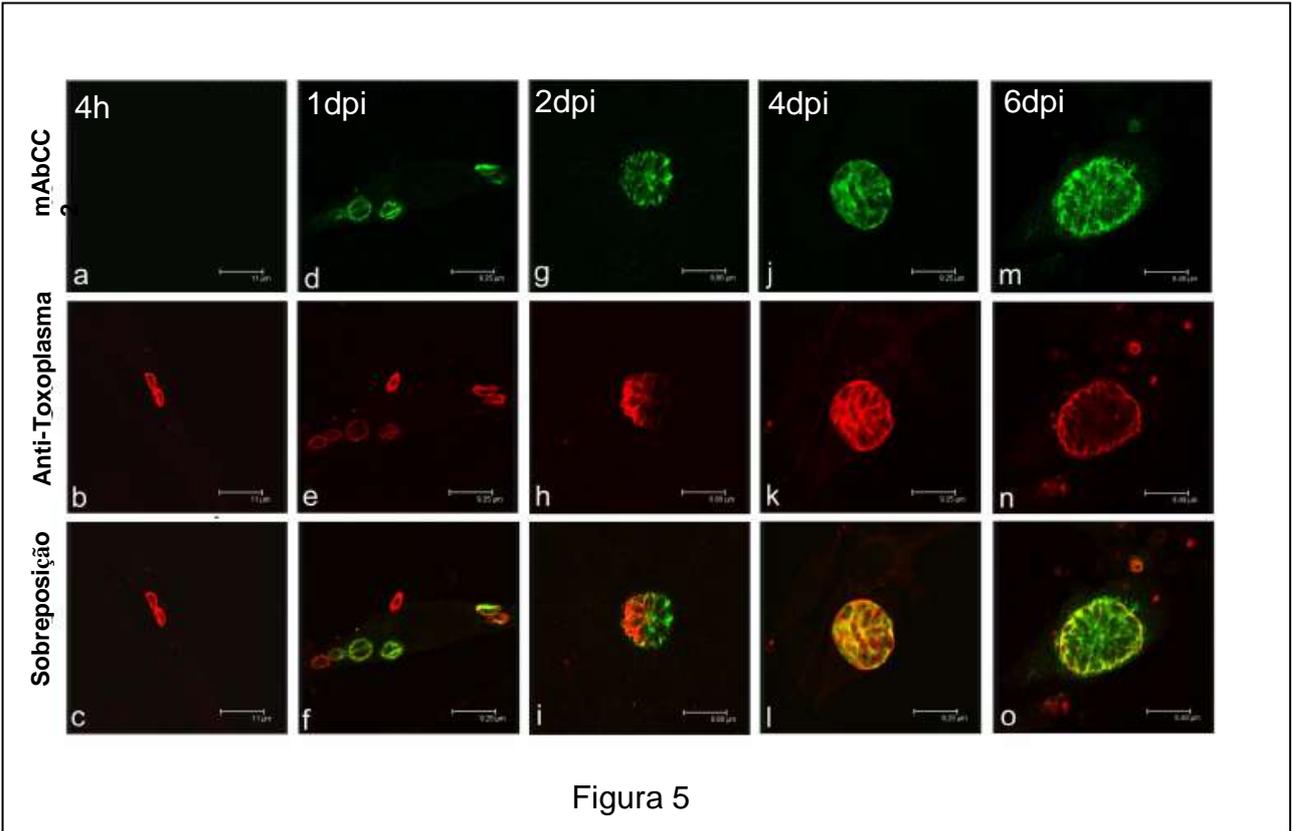


Figura 5

esqueléticas (Fig. 5g-i) e a reatividade ao anticorpo CC2 com a matriz do VP contendo bradizoítos foi bastante aparente (Fig. 5g,i), envolvendo um número crescente de vacúolos positivos. A quantificação de VP de *Toxoplasma* em células musculares esqueléticas revelou um aumento proeminente do percentual de vacúolos reativos ao anticorpo anti-CC2, ao longo do período de observação de 24 h até o 6º dia. Após 24 h de interação, $23,8 \pm 3,4\%$ dos vacúolos foram CC2 positivos. A conversão dos parasitos seguiu aumentando para $31,0 \pm 2,3\%$, após 48h, $33,7 \pm 3,5\%$ após 96 h, alcançando $46,0 \pm 3,5\%$ após 144 h de infecção (Fig. 6).

2.2. Monitoramento da expressão de genes *Toxoplasma*-estágio por qRT-PCR.

Objetivando confirmar os dados obtidos de que o *Toxoplasma* prontamente se diferencia para o estágio bradizoíto em células musculares esqueléticas, a nível molecular, transcritos dos genes estágio específico ENO1 e ENO2 foram quantificados por RT-PCR em tempo real. A expressão de ambos os genes foi calculada relativa à expressão do “house-keeping gene” α -tubulina visando considerar o aumento de mRNA devido a replicação do *T. gondii* ao longo do tempo, além de considerar possíveis diferenças no isolamento de mRNA entre diferentes amostras.

A expressão relativa do gene ENO2, específico para o estágio taquizoíta, não alterou significativamente desde o primeiro dia de infecção até o sexto dia em culturas primárias de células musculares esqueléticas (Fig. 7). Em contraste, os níveis de transcritos de ENO1, específico para o estágio bradizoíta, continuaram a crescer desde as 4 horas até o final da observação com o aumento mais proeminente sendo observado aos 4º e 6º dia da infecção corrente (Fig. 7).

3. Monitoramento da diferenciação de células de linhagem de mioblasto de rato

As células de linhagem de mioblasto de rato necessitam de um estímulo transiente: meio de cultivo rico para um meio de cultivo com redução de nutrientes, desencadeando então, o processo de diferenciação celular. Uma análise geral de todos os meios e os parâmetros analisados para eleger o melhor meio de diferenciação da linhagem de mioblastos pode ser vista na Tabela 2. Foram

Figura 6: Estágio conversão espontânea do *T. gondii* em culturas primárias de CME na ausência de fatores externos de estresse.

Quantificação de vacúolos contendo bradizoítos após 4 até 144 horas de infecção. As barras representam a média dos experimentos com o desvio padrão. Após 24 h de interação $23,8 \pm 3,4\%$ dos vacúolos foram CC2 positivos. A conversão dos parasitos foi crescente $31,0 \pm 2,3\%$, após 48h, $33,7 \pm 3,5\%$ após 96 h, alcançando $46,0 \pm 3,5\%$ após 144 h de infecção

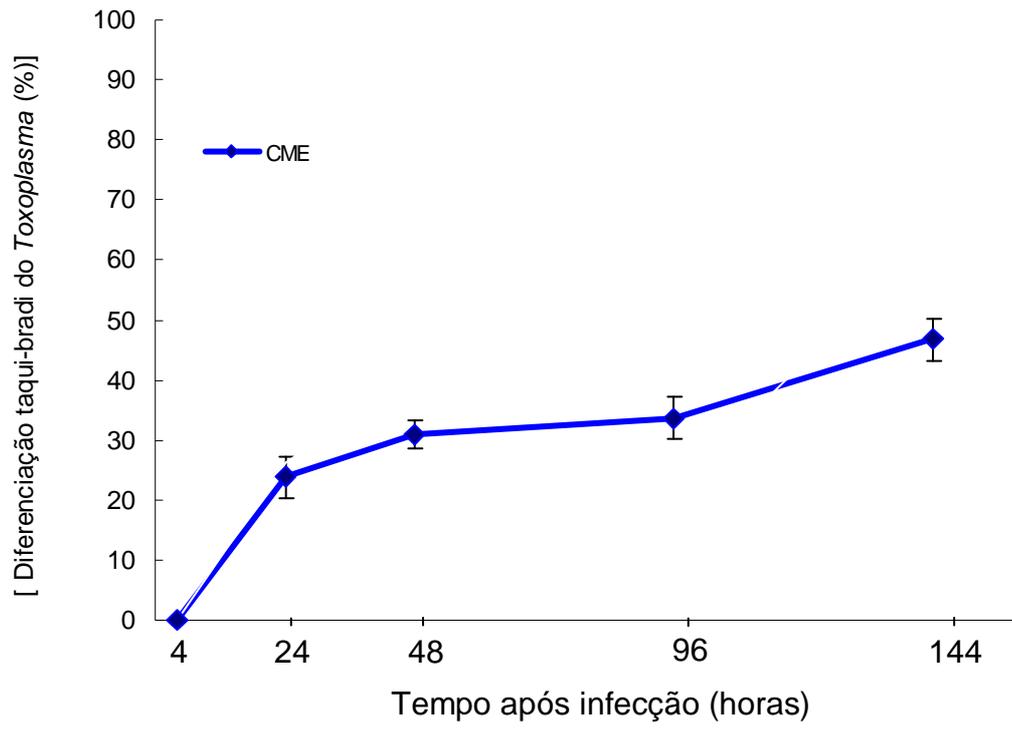


Figura 6

Figura 7: Monitoramento da expressão dos genes ENO1 e ENO2, *Toxoplasma*-estágio específico, por RT-PCR em tempo real.

A expressão relativa do gene ENO2, taquizoíto específico, não alterou significativamente desde o primeiro dia de infecção até o sexto dia em CME. Já os níveis de transcritos de ENO1, bradizoíto específico, continuaram a crescer desde as 4 horas até o final da observação. Aumento mais proeminente foi observado nos 4° e 6° dias da infecção. A expressão de ambos os genes foi calculada relativa à expressão do “house-keeping gene” α -tubulina.

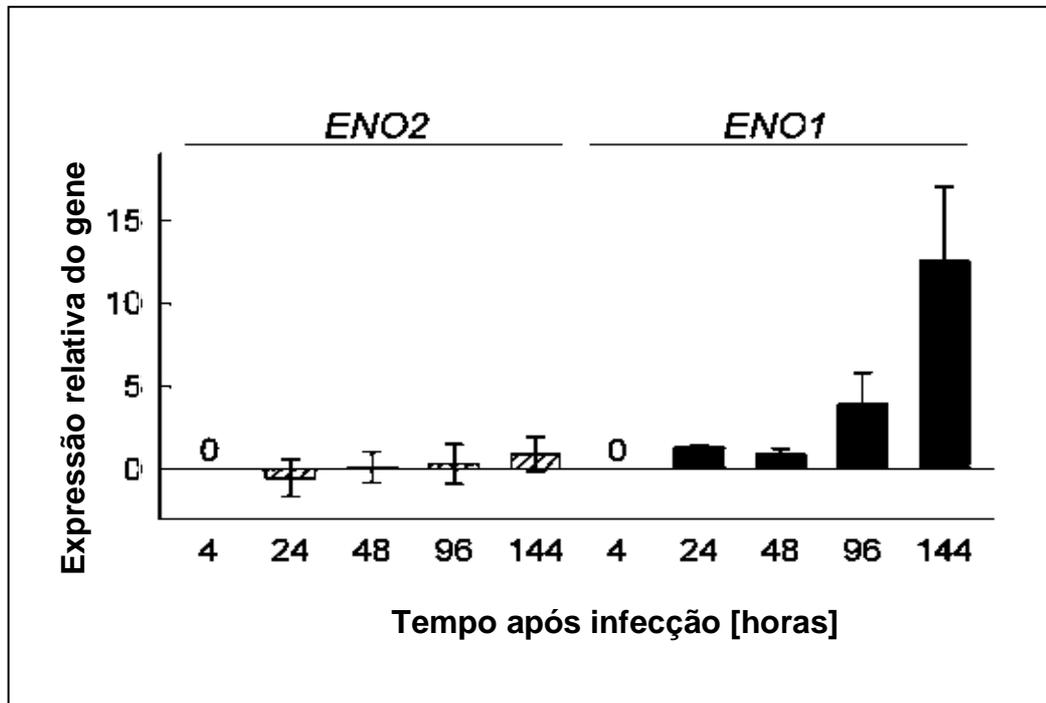


Figura 7

Tabela 2: Análise geral das culturas após 7 dias de incubação com meio DMEM suplementado ou não com soro. Análise do comportamento das culturas segundo os parâmetros: proliferação, viabilidade e diferenciação celular.

Tabela 2: Meios de diferenciação utilizados para miogênese da linhagem L6.C10

Meio de cultivo / Parâmetros analisados	0% SFB	2% SFB	2% SC	10% FCS
Proliferação	+	++	++	+++
Viabilidade celular	+	+++	+++	+++
Diferenciação celular	+++	+++	++	+

+=baixo; ++ = satisfatório; +++=ideal

consideradas a proliferação, viabilidade e diferenciação celular. Após 2 dias de cultura, os mioblastos mantidos somente em meio Dulbecco apresentaram alta perda celular. Por outro lado, a formação de miotubos jovens mostrou-se imediata nestas condições após 2 (Fig. 8a) e 4 dias (Fig. 8b) de indução da diferenciação. Após 7 dias, foi possível observar o longo de toda superfície plaqueada, miotubos ainda jovens, em alinhamento celular e muitos mioblastos ainda sem entrar no programa miogênico (Fig. 8c).

Os mioblastos mantidos em meio suplementado com 2% SFB apresentou, após 2 dias de cultivo nestas condições, uma proliferação celular notavelmente melhor que as mantidas em meio simples (Fig. 9a). Este fato proporcionou uma maior proximidade das células e formação de miotubos jovens (cerca de 2-3 núcleos por sincício) (Fig. 9b) e miotubos maduros, robustos de ramificados, após 7 dias de cultivo (Fig. 9c).

A suplementação do meio Dulbecco com 2% soro de cavalo apresentou também uma diminuição da multiplicação celular (Fig. 10a) e formação de poucos miotubos após 4 dias indução da diferenciação (Fig. 10b). No 7º dia, as culturas não apresentaram mudanças significativas, mantendo o número reduzido de miotubos (Fig. 10c).

Os mioblastos mantidos em Dulbecco suplementado com 10% SFB, meio padrão aplicado para manutenção de rotina dos mioblastos, proporcionou uma intensa atividade proliferativa das culturas ao longo de toda cinética ao longo dos 7 dias de observação (Fig. 11a). Raros miotubos foram visualizados revelando uma baixa miogênese (Fig. 11b). A intensa multiplicação celular levou a formação de culturas densas, com alto percentual de mioblastos/miócitos, inapropriadas para a proposta de nossos ensaios (Fig. 11c).

4. Monitoramento da conversão de taquizoíto-bradizoíto de *T. gondii* em linhagens celulares de músculo (L6C10) e de fibroblasto (L929)

Alta taxa de conversão para o estágio bradizoíto do *T. gondii* foi observada após infecção da linhagem de mioblasto de rato L6.C10 (Fig. 12a-o), que apresentou cerca $26,1 \pm 3,5\%$ de diferenciação taquizoíto-bradizoíto, após as primeiras 24 h de infecção (Fig. 14). Em contraste, células da linhagem de fibroblasto de camundongo L929 infectadas pelo *T. gondii*, proporcionaram neste mesmo período de infecção somente $3,2 \pm 0,8\%$ de estágio conversão de taquizoítas de *Toxoplasma* (Fig. 13e-f), não ultrapassando o percentual de 20% após 144 h de infecção (Fig. 14).

Figura 8: Análise da miogênese de células de linhagem de mioblasto de rato (L6.C10) mantidas em meio Dulbecco por microscopia de contraste de fase.

A: Culturas mostrando, após 2 dias de cultura, formação de miotubos jovens (seta), apesar da alta perda celular, e/ou inibição da proliferação, e/ou baixa adesão celular.

B: Imagens mostrando formação de miotubos jovens (seta) (4 dias).

C: Imagem mostrando alinhamento celular e com predominância de fusão entre miotubos (*) (7 dias).

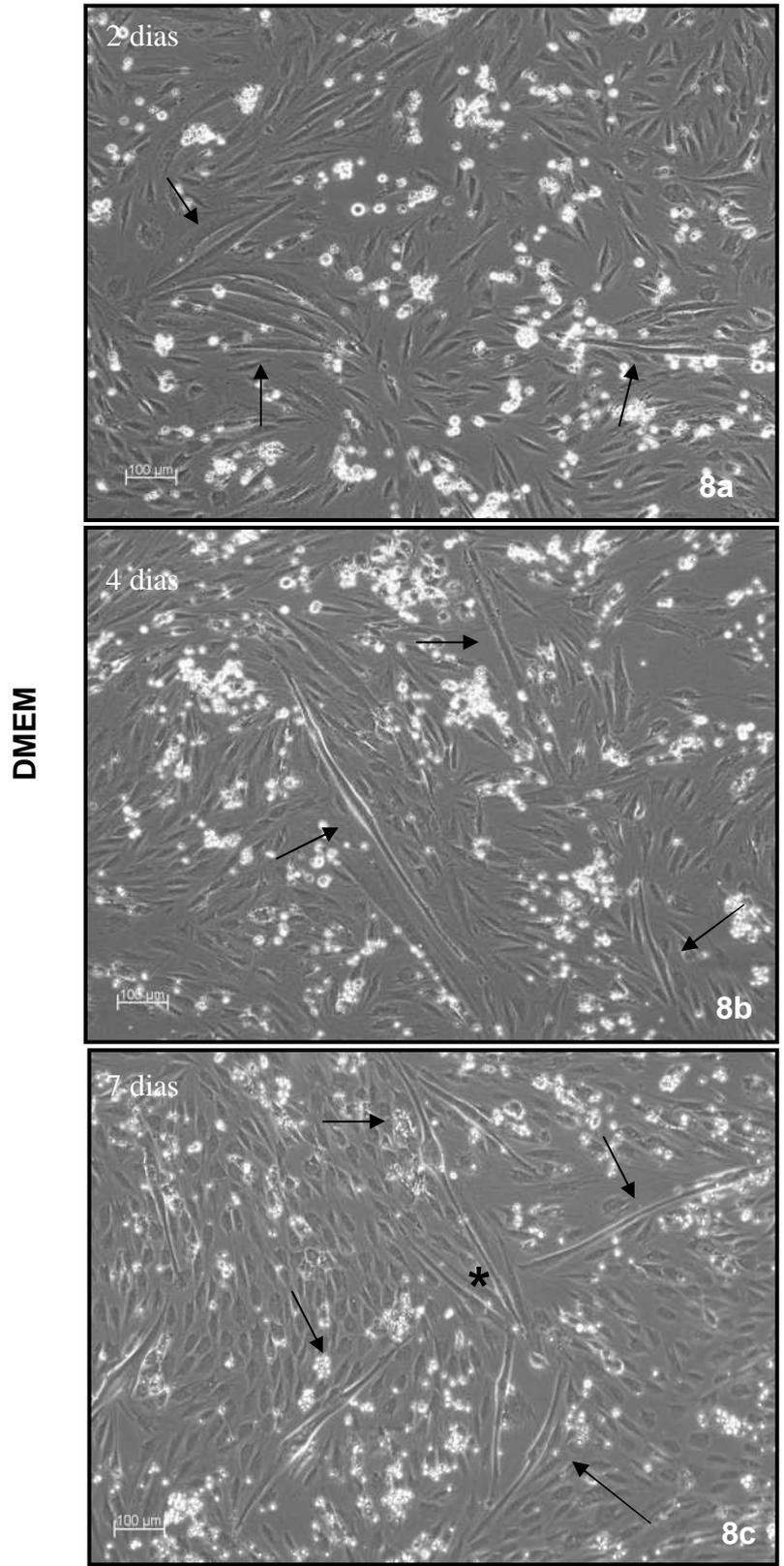


Figura 8

Figura 9: Análise da miogênese de células de linhagem de mioblasto (L6.C10) por microscopia de contraste de fase mantidas em DMEM suplementado com 2% SFB.

A: Proliferação celular notavelmente melhor que as mantidas em meio simples, após 2 dias de cultivo,

B: Formação de miotubos jovens (cerca de 2-3 núcleos por sincício) (seta) (4dias).

C: Miotubos maduros, robustos e ramificados, após 7 dias de cultivo (seta) indicando indução da diferenciação de células de linhagem de mioblasto.

DMEM + 2% soro fetal bovino

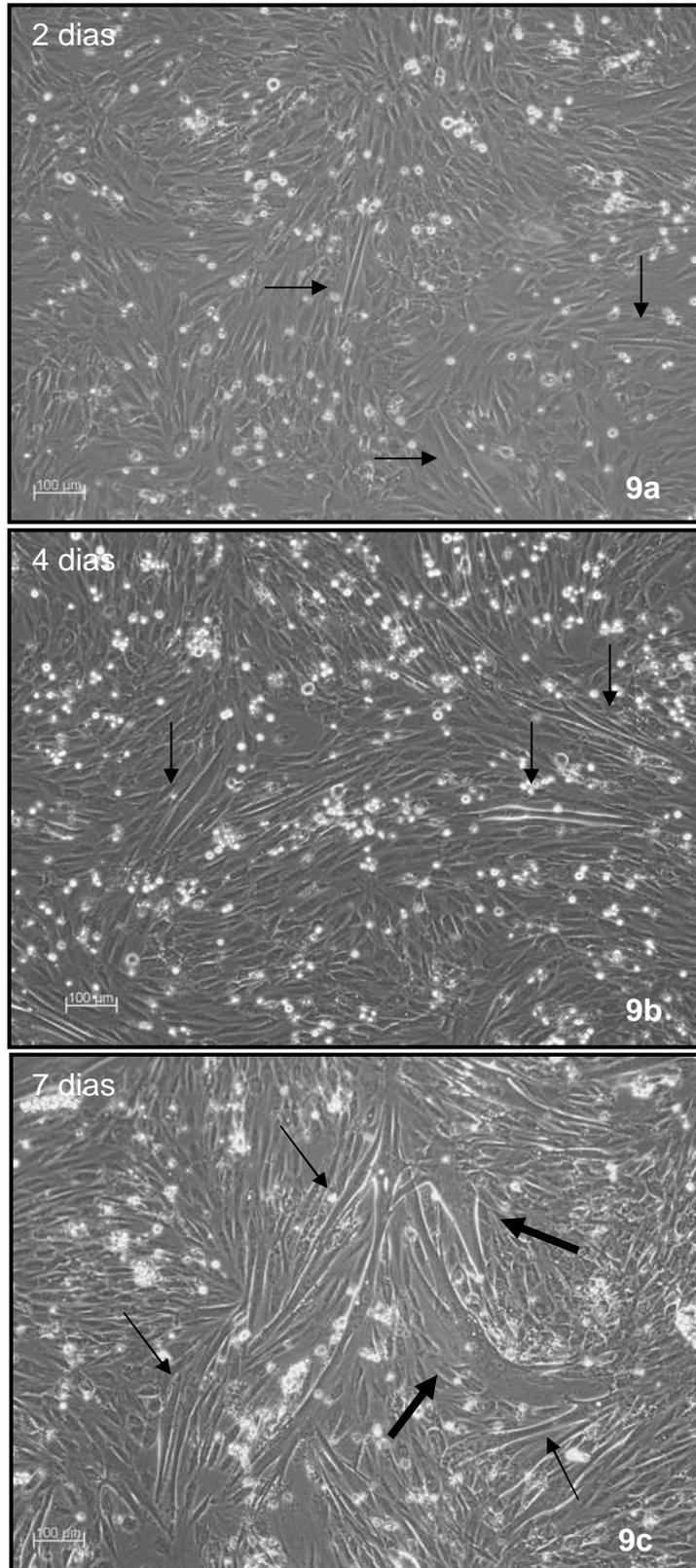


Figura 9

Figura 10: Análise da miogênese de células de linhagem de mioblasto (L6.C10) por microscopia de contraste de fase em meio DMEM suplementado com 2% soro de cavalo.

A: Imagem mostrando multiplicação celular reduzida.

B: Miotubos jovens formados na cultura.

C: Após 7 dias de cultivo, as culturas apresentaram baixa fusão entre miotubos.

DMEM + 2% soro de cavalo

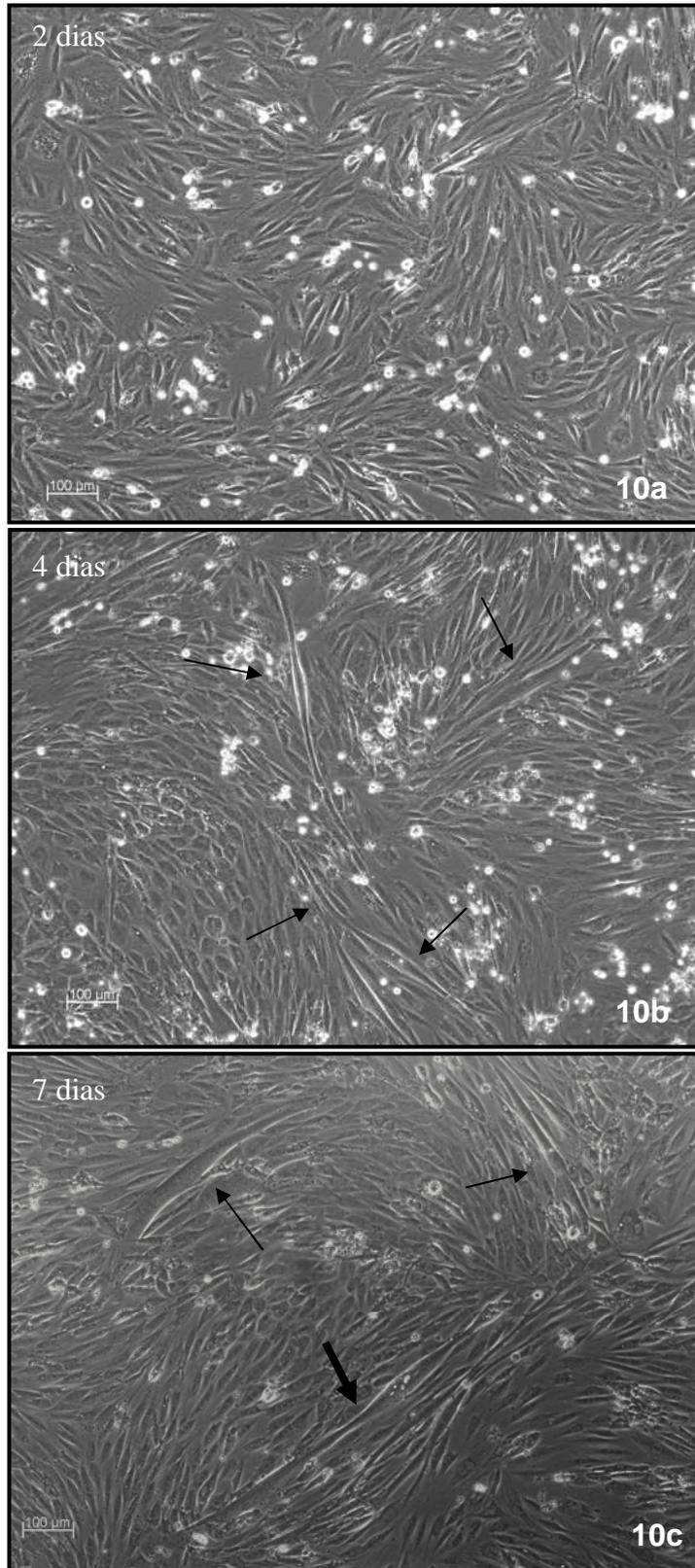


Figura 10

Figura 11: Análise da miogênese de células de linhagem de mioblasto (L6.C10) por microscopia de contraste de fase em DMEM suplementado com 10% SFB.

A: Intensa atividade proliferativa dos mioblastos

B: Imagem mostrando raros miotubos formados após 4 dias de cultivo em meio de diferenciação.

C: Intensa multiplicação celular com manutenção de alto número de miócitos e baixa fusão celular.

DMEM + 10% Soro fetal bovino

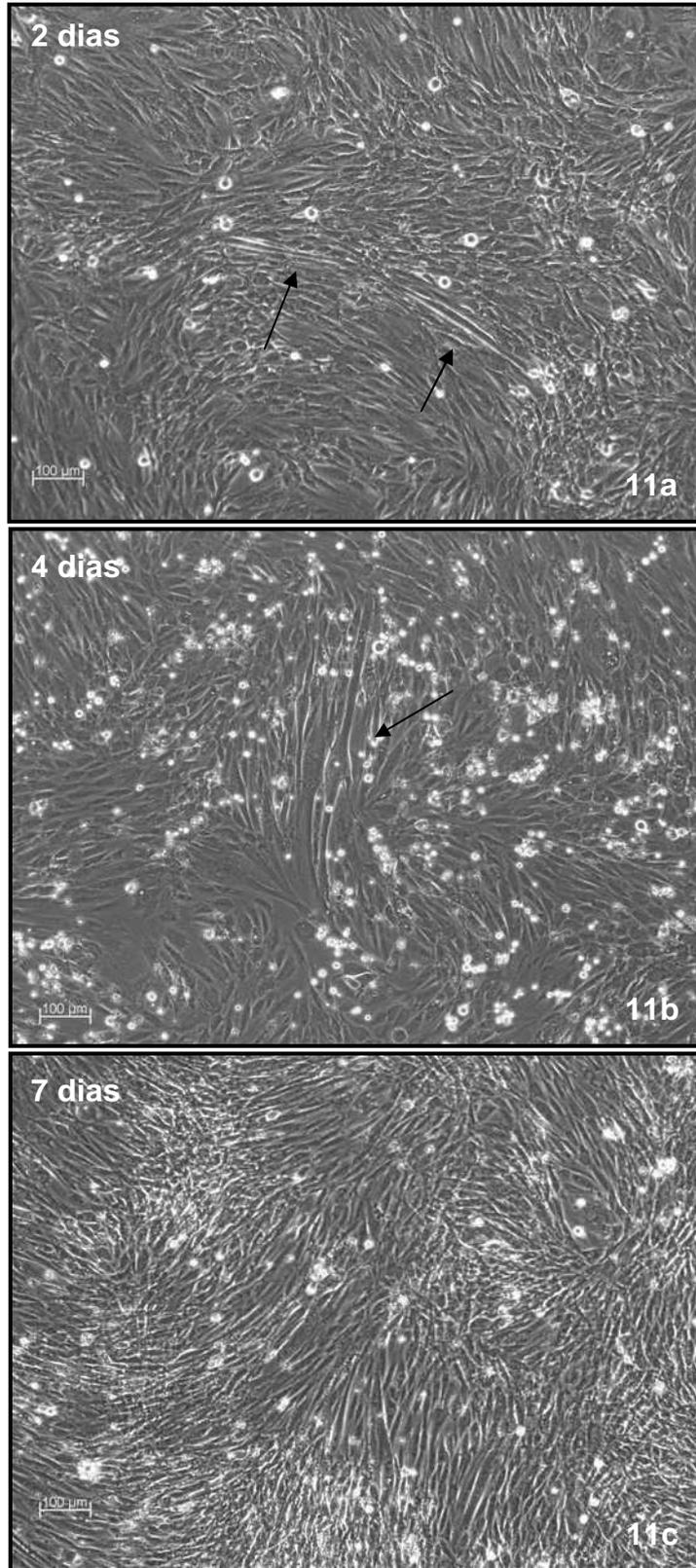


Figura 11

Figura 12: Estágio conversão espontânea do *T. gondii* em culturas diferenciadas de linhagens celulares de mioblasto (L6C10). O monitoramento da conversão de taquizoíto-bradizoíto de *T. gondii* desde 4h até 144 horas de infecção.

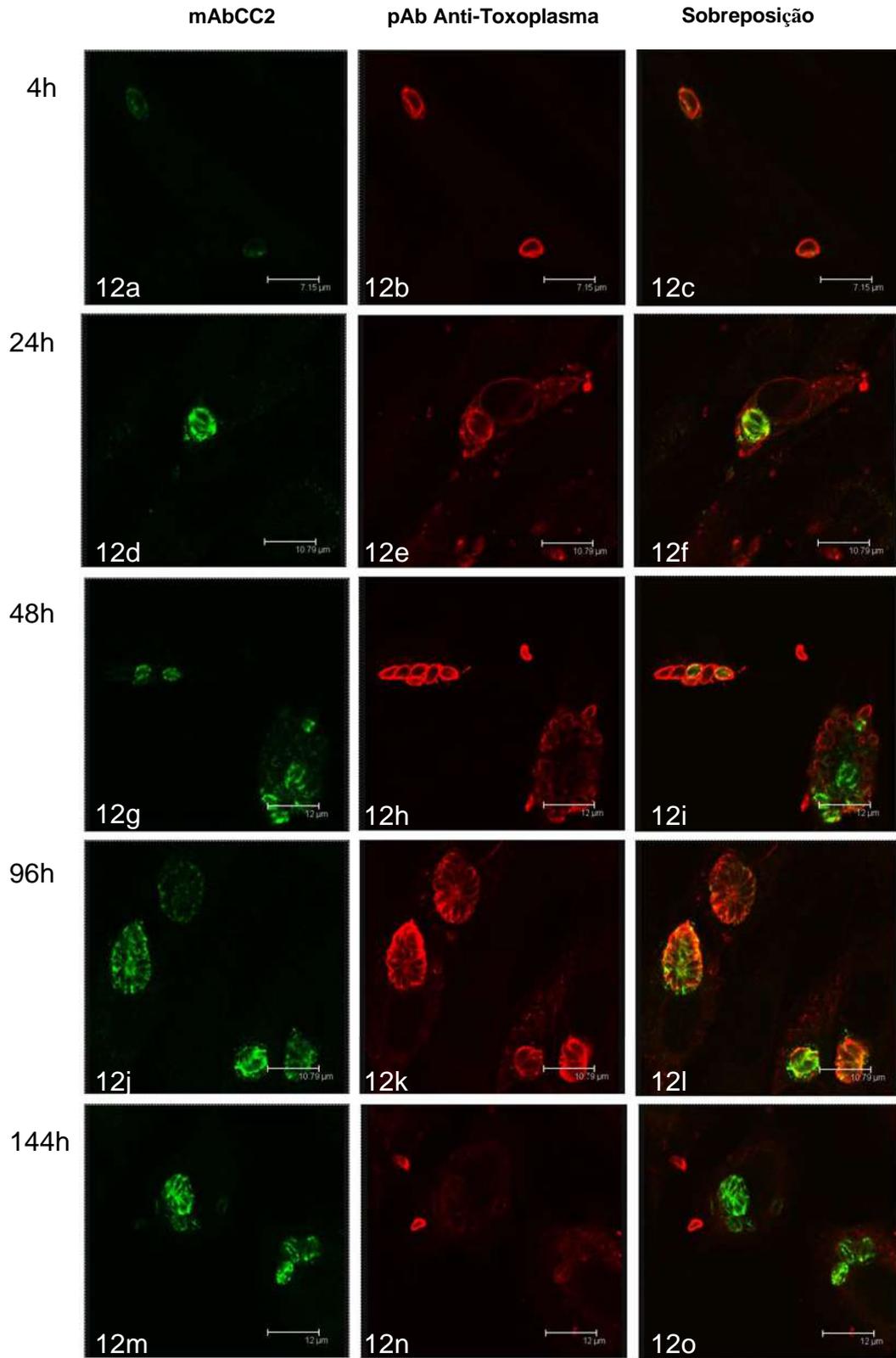


Figura 12

Figura 13: Monitoramento por microscopia confocal a laser da conversão de taquizoíto-bradizoíto de *T. gondii* em linhagens de fibroblasto (L929). O monitoramento da conversão de taquizoíto-bradizoíto de *T. gondii* desde 4h até 144 horas de infecção.

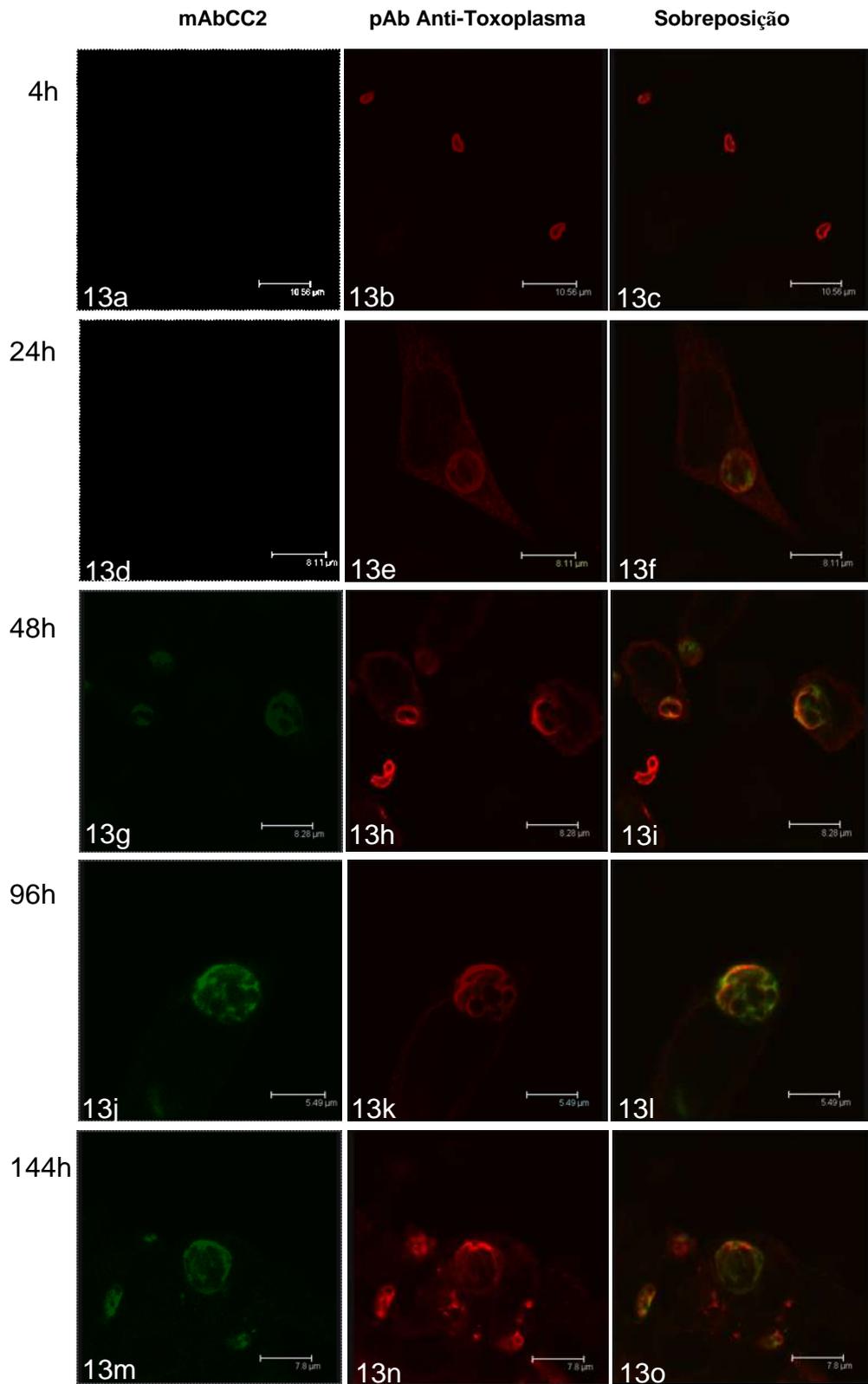


Figura 13

Figura 14: Gráfico mostrando comparativamente as taxas de conversão do *Toxoplasma* em culturas primárias de CME (azul), em células diferenciadas de linhagem de mioblasto (rosa), em linhagem de fibroblasto (vermelho). Gráfico mostra altas taxas de estágio conversão em CME. Observa-se que CME infectadas pelo *T. gondii* e em presença de IFN gama e LPS (verde) não foram capazes de induzir a conversão dos taquizoítos para bradizoítos. As barras representam a média dos experimentos com o desvio padrão.

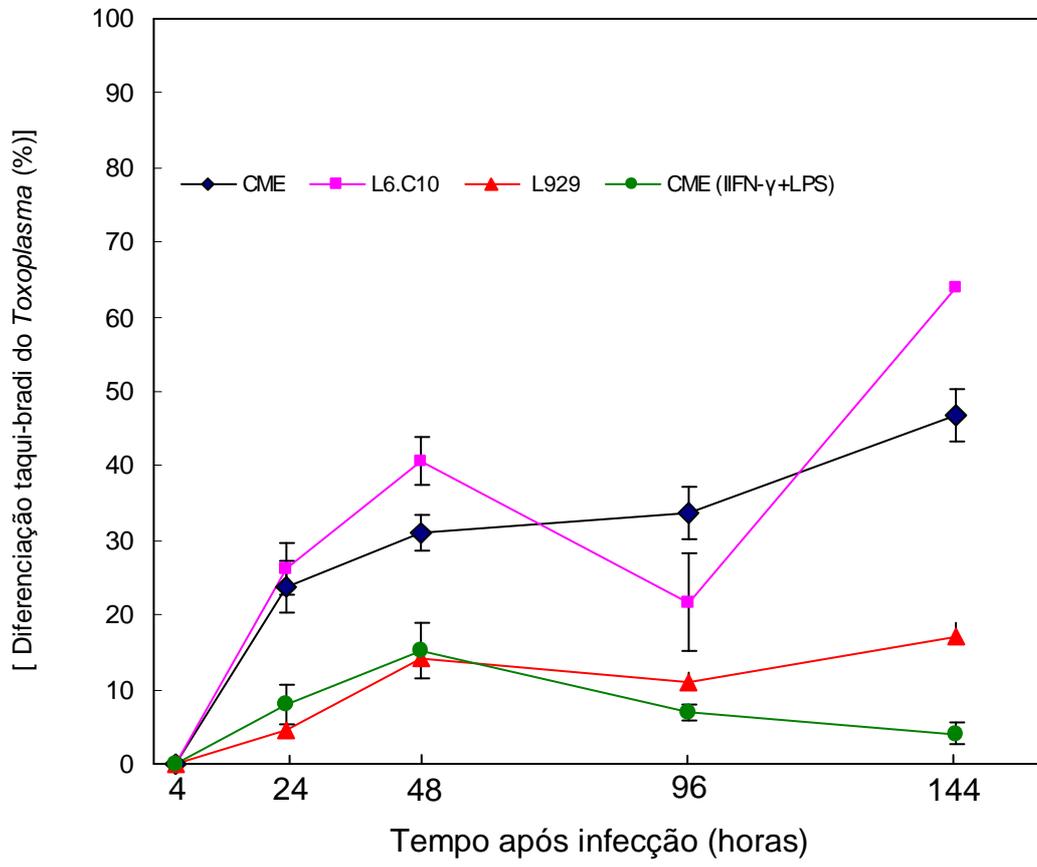


Figura 14

5. Indução da estágio conversão

5.1 Aumento do pH e ausência de CO₂ em cultura primária de CME

O ensaio do estágio conversão do *Toxoplasma* através da indução com meio alcalino (pH 8.1) prejudicou fortemente a viabilidade celular. Com o objetivo de contornar a morte celular, o meio foi adicificado para pHs mais baixos - 7.8 e 7.6 -, sem sucesso.

5.2 Indução do estágio conversão com IFN-gama em presença de LPS

A estágio conversão do *T. gondii*, mediada por IFN-gama na presença de LPS, apresentou baixas taxas de diferenciação do parasito: 0 %, 8,0±2,1 %; 11, 2±1,0%, 7,0±1,0% e 4,1±1,4%, após 4 h, 1, 2, 4 e 6 dpi, respectivamente (Fig. 15).

Figura 15: Monitoramento por microscopia confocal a laser da conversão de taquizoíta-bradizoíta de *T. gondii*. em cultura primária de CME em presença de IFN gama e LPS. Apesar da baixa taxa de estágio conversão, alguns poucos parasitos foram reativos ao anticorpo que reage com bradizoítos, visualizados em verde.

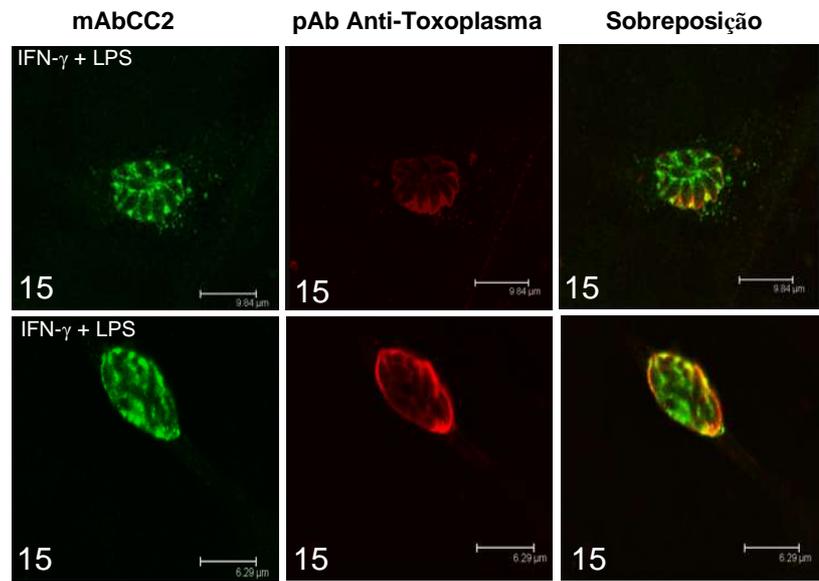


Figura 15

DISCUSSÃO

V DISCUSSÃO

A presente tese abordou aspectos biológicos de culturas primárias de células musculares esqueléticas *in vitro* através da revelação da expressão gênica de fatores reguladores da miogênese. Em uma outra vertente, foi analisada a conversão de taquizoítos-bradizoítos de *T. gondii* da cepa NTE na ausência de fatores de estresse exógenos em diferentes tipos celulares: (i) culturas primárias de músculo esquelético (CME), (ii) linhagem de mioblasto de rato (L6.C10) e, (iii) linhagem de fibroblasto (L929). Adicionalmente, estudos preliminares de estágio-conversão induzida por interferon na presença de lipopolissacarídeo em CME também foram realizados.

Nossos resultados sugerem fortemente que a interconversão de taquizoítos em bradizoítos seja modulada pela célula hospedeira, diante da evidenciação de conversão espontânea em células musculares esqueléticas quando comparada com os outros tipos celulares testados.

Estágio-conversão, formação cística e resposta celular têm sido estudados em tecidos do cérebro de camundongos e de ratos infectados *in vivo* (Gazzineli e cols., 1992; Sclüter e cols., 2001; 2003). No entanto, nenhuma ou pouca atenção tem sido dada, até o momento para o estudo deste fenômeno em células musculares esqueléticas, embora esta seja uma das células alvo na fase crônica da toxoplasmose (Andrade e cols., 1998, 1999, 2001; Monteiro-Leal e cols., 1998; Barbosa e cols., 1999, 2005; Guimarães e cols., 2008). Outro aspecto de igual relevância é o papel da interconversão como uma das mais importantes vias de transmissão do parasito em humanos, através da ingestão de carne crua ou mal passada contendo cistos do parasito (Frenkel, 1973; revisto em Weiss e Kim, 2000 e em Tenter e cols., 2000).

O conjunto de resultados obtidos na presente tese gerou um manuscrito submetido à publicação. Com base nos ensaios desenvolvidos para a geração desse artigo, foram acumuladas experiências que possibilitaram a redação de um artigo de revisão com discussão em profundidade das principais condições de estresse celular utilizadas para indução da conversão do *Toxoplasma* entre os estágios taquizoíta e bradizoíta em culturas *in vitro*. Esta revisão traz em destaque as células musculares esqueléticas como um modelo eficiente para o estudo do fenômeno da diferenciação espontânea do parasito.

Estudos anteriores *in vivo* indicam a predileção pelo *T. gondii* em formar cistos nas musculaturas cardíaca e esquelética e no sistema nervoso central (Jacobs, 1967; Mehlhorn e Frenkel, 1980; Dubey, 1988; Frenkel, 1990; Dubey e cols., 1998). Recentemente, foi postulada a hipótese que relaciona o papel protetor da neuroglobulina e mioglobulina frente ao efeito toxoplásmico do óxido nítrico (Ascenzi e cols., 2005), também observado durante a infecção com *Trypanosoma cruzi* em cardiomiócitos e *Plasmodium falciparum* em eritrócitos (Taylor-Robinson, 1998; Ascenzi e cols., 2001). Neste contexto, o efeito protetor dessas proteínas poderia justificar a permanência por longo tempo do *T. gondii* como cisto tecidual, na retina e nos músculos cardíaco e esquelético. Na presente tese, nós utilizamos como modelo de estudo da conversão taquizoíta-bradizoíta, células musculares esqueléticas obtidas de cultura primária e linhagens de mioblastos e de fibroblastos, sem a introdução de estresse exógeno, objetivando-se analisar se o tipo celular era determinante neste processo. Previamente nós descrevemos a cistogênese do *T. gondii* em CME *in vitro* através da infecção com bradizoítos (Guimarães e cols., 2008). Nossos estudos mostraram pela primeira vez, independente de estímulos exógenos, altas taxas de diferenciação de taquizoítos-bradizoítos de *T. gondii* em células musculares (CME w linhagem L6.C10). Em contrapartida, os ensaios com linhagem L929 mostraram, após 48 horas de infecção com taquizoítos, um baixo percentual de vacúolos contendo bradizoítos.

A alta relevância de CME para investigar a diferenciação de taquizoítos em bradizoítos de *Toxoplasma* exigiu o estabelecimento de culturas de longo termo. Esta metodologia foi adaptada da literatura e muito bem estabelecida pelo nosso grupo (Barbosa e cols., 2000). O estabelecimento de culturas de longo termo, só foi possível em função do revestimento prévio das lamínulas de vidro e das garrafas plásticas com poli-ornitina e laminina, o que representou uma etapa crucial para manutenção das culturas, assegurando: (i) adesão ao substrato por longos períodos; (ii) contração espontânea dos miotubos; e, (iii) permanência da monocamada infectada por períodos de até dez dias. A laminina é uma proteína de matriz extracelular muito utilizada para cultivo de células musculares, auxiliando inclusive no alinhamento das células e sua diferenciação (Mechan, 1991). A caracterização da miogênese mostrou a diferenciação das culturas, através do elevado número de miotubos formados *in vitro* e da expressão de fatores reguladores da miogênese como Myf5 e MyoD, ratificando o que tem sido descrito em outros sistemas (revisto em Yablonka-Reuveni e cols., 2008 e em Sterwart e Rittweger, 2006). Além disso, as

culturas se caracterizavam fenotipicamente por conter miotubos altamente diferenciados, de diversos tamanhos e calibres, que muitas vezes atravessam toda extensão da superfície plaqueada. Estes miotubos, que apresentavam cerca de 10 a 20 núcleos, se contraíam espontaneamente, como documentado por vídeo microscopia.

Modelos celulares *in vitro* empregados para o estudo da diferenciação de taquizoíta para bradizoíta de *T. gondii* têm sido estabelecidos, empregando geralmente linhagens celulares e condições de estresse que objetivam mimetizar a resposta imune do hospedeiro (Bohne, 1996). O desenvolvimento de bradizoítos *in vitro*, até o momento, tem sido apontado como um estímulo mediado por estresse que leva à adaptações metabólicas e morfológicas do parasito. Estas condições incluem tratamento com interferon gama (Bohne e cols., 1993), inibidores de mitocôndria (Bohne e cols., 1994), pH alcalino (Soête e cols., 1993), altas temperaturas (Soête e cols., 1994), estresse de nutrientes (Fox e cols., 2004) e drogas que limitam a multiplicação do parasito (Bohne e cols., 1993; Gross & Pohl, 1996). Condições de estresse como pH alto, por exemplo, facilitam consideravelmente a análise do processo de cistogênese. Este sistema artificial, porém, pode não necessariamente refletir os requerimentos da estágio-conversão durante o curso natural da infecção, tornando-se assim uma estratégia bastante questionável quando se investiga a conversão do parasito. O desenvolvimento de bradizoítos deve compartilhar aspectos comuns a processos de diferenciação de outros microorganismos, induzidos por estresse, como por exemplo, privação de nutrientes (Weiss e Kim, 2000). Sendo um parasito obrigatoriamente intracelular, é bem provável que a diferenciação do *T. gondii* dependa parcial ou predominantemente de fatores reguladores diferentes dos observados em organismos comensais ou de vida livre. Assim, descobertas recentes, apóiam a idéia de que a formação de bradizoítos deve ser fisiologicamente regulada por outros fatores que não o estresse (Payne e cols., 2003; Sinai e cols., 2004; Molestina e Sinai, 2005; Radke e cols., Radke e cols., 2006). Uma outra variável que deve ser considerada é o tipo de cepa do parasito, uma vez que cepas avirulentas do tipo II e III geralmente se diferenciam em altas taxas do que as virulentas do tipo I (Bohne e cols., 1994; McHugh e cols., 1994; Radke e cols., 2005). Além disso, o estágio infectivo do *Toxoplasma* também deve ser crítico para a conversão do parasito, uma vez que uma alta freqüência de desenvolvimento de bradizoítos a partir de taquizoítos foi observada após inoculação de esporozoítos (Jerome e cols,

1998; Radke e cols., 2003). Assim, o desenho experimental empregado na presente tese incluiu cepa do *T. gondii* tipo II avirulenta com alta capacidade de indução da conversão e formação de cistos e formas taquizoítos como estágio infectivo.

Uma das questões também propostas na presente tese foi esclarecer se, a variável “tipo celular” se somaria à variável “estresse aplicado”, provocando um diferencial na taxa de estágio-conversão e ainda, se o parasito responde diretamente ao estresse ou às mudanças na célula hospedeira provocadas por este estímulo. Na verdade, parece existir um consenso de que seria uma combinação dos dois eventos, considerando-se que parasitos submetidos às condições de estresse, na ausência de célula hospedeira, também apresentam altas taxas de diferenciação quando comparados aos parasitos submetidos em condições normais de cultura (pH 7.2) (Yahiaoui e cols., 1999). Na nossa experiência e nas condições experimentais empregadas, a tentativa de manipulação do meio de cultura pela aplicação de diferentes valores de pH (7,6-8.2), visando induzir o estágio-conversão de *T. gondii* em células musculares, não obteve sucesso, diferentemente do que tem sido descrito em outros tipos celulares (Soête e cols., 1993, 1994). As células, principalmente CMEs, não suportavam tal agressão, sofrendo alteração morfológica, incompatível com o fenótipo das células controle, com destacamento da superfície plaqueada, inviabilizando a realização de experimentos variando o pH do meio.

A estágio-conversão de *T. gondii* foi acompanhada por períodos de 4 h até 6 dias pós-infecção. Uma das ferramentas utilizadas para acompanhamento da conversão taquizoíta-bradizoíta, foi a imunocitoquímica empregando anticorpos estágio específicos. Em estudos anteriores foi demonstrado por imunofluorescência e citoquímica ultra-estrutural, que o anticorpo CC2 marca a parede de cistos teciduais de camundongos em fase crônica da infecção, isto é, estruturas características de cistos teciduais maduros de *Toxoplasma* (Gross e cols., 1995; Ferguson, 2004). Apesar de ainda faltar um marcador antigênico definitivo para este tipo de cisto (Tomavo e Weiss, 2007), a predominância de marcação CC2 positiva (Fig. 3m-o) indica que se trata de vacúolos parasitóforos contendo bradizoítos maduros. Recentemente, demonstramos por abordagens ultra-estruturais que a cistogênese do *T. gondii* em CME se completa 96 h após infecção por bradizoítos, resultando na formação de parede cística (Guimarães e cols., 2008). Se o tipo célula hospedeira é um fator determinante para a conversão taquizoíta-bradizoíta do parasito é ainda uma questão controversa. As CME obviamente proporcionam um

ambiente propício que sustenta o desenvolvimento de bradizoítos e, pelo menos até um certo ponto, a maturação dos cistos teciduais, sem a necessidade de estresse exógeno. Desta forma, nós propomos que em contexto molecular e celular adequados, altos níveis de diferenciação para bradizoítos de *T. gondii* ocorra espontaneamente, particularmente em células musculares esqueléticas.

Taquizoítos de *Toxoplasma* se mostraram capazes de infectar as células musculares como previamente descrito (Andrade e cols., 2001; Barbosa e cols., 2005). *T. gondii* apresenta uma ativa invasão em virtualmente todos os tipos de células de mamíferos (Dobrowolski e Sibley, 1996) invasão esta, direcionada pelo glideosomo do parasito (Keely e Soldati, 2004). Após 24 h de infecção, CMEs apresentavam parasitos no interior de vacúolos e marcados pelo anticorpo CC2. Vacúolos parcialmente marcados por CC2 indicaram que naquelas culturas, não houve sincronização do estágio-conversão, em concordância com a descrição em outros modelos celulares (Tomavo e cols., 1991; Bohne e cols., 1993b; Soête e cols., 1993; 1994; Weiss e cols., 1995). Além disso, em diferentes tipos celulares infectados com formas taquizoítas e/ou bradizoítas de *T. gondii* têm sido identificados dentro de um mesmo vacúolo parasitos expressando antígenos específicos para as duas formas infectivas. Assim, considerando-se que todos os parasitos dentro de um vacúolo parasitóforo sejam derivados de um único parasito, isso indica que o disparo da conversão taquizoíto↔bradizoíto não seja sincronizado, como já proposto por outros autores (Dardé e cols., 1989; Bohne e cols., 1993b; Soête e cols., 1993). Então, parasitos provenientes de uma população homogênea (cistos obtidos de cérebro ou taquizoítos obtidos da cavidade peritoneal) nas mesmas condições de cultura podem se desenvolver por diferentes vias, resultando em uma heterogeneidade de estágios na mesma célula e até mesmo em um único vacúolo parasitóforo. O percentual de vacúolos reativos para CC2 foi mantido nos 2° e 4° dias pós-infecção, aumentando ao longo da cinética e culminando no 6° dia com aproximadamente 50% de reatividade. A mesma cinética foi realizada com células de linhagem de mioblasto e mostraram também contribuir com um percentual de mais de 40% de estágio-conversão no 2° dia de infecção. Ao longo do período de observação a partir do 3° dia ocorreu uma queda no número de bradizoítos intracelulares e progressivamente um aumento de taquizoítos, decorrente da reativação do processo de estágio-conversão, levando à re-diferenciação em taquizoítos. Como era previsto, os taquizoítos rapidamente se multiplicaram, estabelecendo o ciclo lítico do *T. gondii* e levando à lise das células hospedeiras.

Nessas condições, ocorreu a liberação tanto das formas taquizoítas quanto de bradizoítas. Eventualmente, foi possível verificar em algumas culturas que a diferenciação se manteve, chegando a atingir cerca de 64% de vacúolos contendo bradizoítos no 6º dia. Os resultados obtidos com linhagem de fibroblasto foram acentuadamente diferentes, mostrando um percentual bem baixo após o primeiro dia de infecção, se mantendo assim ao longo do experimento, não atingindo 20% de reatividade no 6º dia. Os resultados descritos até o momento sugerem que durante a conversão *in vitro* taquizoíta ↔ bradizoíta de *T. gondii*, fatores intrínsecos físicos e/ou bioquímicos determinados pelo modelo celular, possam estabelecer o destino intracelular do parasito. Dessa forma, reproduziria o que ocorre no sistema *in vivo*, com o estabelecimento de cistos que levarão à fase crônica da doença, de fundamental importância para a sua manutenção no hospedeiro. A evidência de que a conversão para bradizoítos foi consideravelmente maior em CME do que em fibroblastos, reforça a idéia de que a célula hospedeira impacta drasticamente a diferenciação do *T. gondii* para o estágio de vida latente.

Recentemente, Radke e cols. (2006) demonstraram um papel funcional do autoantígeno-1 humano de divisão celular (CDA-1) em bradizoítos em desenvolvimento em fibroblastos humanos. Enquanto isso, em CME, bradizoítos se desenvolveram espontaneamente, indicando que estas células proporcionam um nicho que promove o estágio-conversão do parasito. Isso nos permite especular que esta conversão pode ser dependente da expressão constitutiva de CDA-1. Esta é uma questão ainda em aberto, como sugerido por Radke e cols. (2006). Já que os miotubos aqui empregados são produtos da progressão do ciclo celular (Sabourin and Rudnicki, 2000), reguladores negativos do ciclo da célula hospedeira, como por exemplo, o CDA -1, são possíveis candidatos que poderiam promover um sinal para o comprometimento do desenvolvimento de bradizoítos de *T. gondii* em CMEs. Se, ou em que extensão o ambiente específico do músculo estriado (Wiendl e cols., 2005) regula a persistência *in vivo* por longo tempo de cistos de *T. gondii*, é um ponto que necessita ser elucidado.

Direcionar o processo da estágio-conversão ao estresse nutricional ocasionado pela morte das células por apoptose ou qualquer outro mecanismo, não se aplica uma vez que: (i) o meio para cultura primária de músculo é muito mais rico em nutrientes quando comparado ao meio empregado para linhagens celulares; (ii) os eventos de estágio-conversão foram monitorados no mínimo em triplicata; (iii) as culturas eram checadas diariamente e o meio trocado a cada dois dias; (iv) apoptose

em células infectadas pelo *T. gondii* é inibida (revisto em Lüder e Gross., 2005), gerando assim a lei da vantagem para a sobrevivência do parasito, garantindo sua multiplicação e permanência por longo tempo no hospedeiro; (v) a cistogênese *in vitro* pode ser acompanhada por até 31 dias em CME com excelente preservação celular (Guimarães e cols., 2008)

Com base nos estudos iniciais de Bohne e cols (1993, 1994) e de Soête (1994) que utilizaram como a adição de drogas como estímulo para a diferenciação, existe o dogma de que este processo ocorre apenas em resposta a fatores exógenos. Em nossos estudos de estágio-conversão não foi utilizada qualquer manobra experimental de ordem física ou química e altos índices de diferenciação foram observados, o que favorece a hipótese de que a conversão espontânea, nas nossas condições de manutenção das culturas, advém de outros fatores que não a resposta a estresse exógeno. Alguns autores têm sugerido, a partir de ensaios com diferentes linhagens celulares, que o tipo celular não contribui de forma importante para a formação de bradizoítos (Dubey e cols, 1999; Lindsay e cols, 1991; McHugh e cols, 1994). No entanto, é importante ressaltar que esta questão nunca foi comparada quantitativamente associado ainda, à falta de modelos celulares “naturais” onde de fato ocorre o processo de diferenciação do parasito desencadeando a cistogênese, por exemplo, o modelo de células musculares esqueléticas. O único artigo que levanta a questão da influência da célula hospedeira nesse processo foi de Jones e cols. (1986), utilizando cultura primária de astrócitos, sem contudo ser conclusivo, por falta de estratégias que pudessem apoiar essa hipótese. Assim, se há fatores intrínsecos da célula que possam direcionar o destino intracelular do parasito, esse é um processo inerente ao sistema biológico natural que não podemos controlar, nem mesmo no sistema *in vivo*. A obtenção da conversão espontânea de *T. gondii* em CME como descrita na presente tese, fortemente possibilita inferir que o tipo celular possa ser um dos fatores indutores desse processo, como deverá ser discutido melhor mais a frente.

Os nossos dados mostraram que na presença de IFN-gama e LPS, as células musculares esqueléticas foram capazes de inibir a conversão de taquizoítas em bradizoítas. Inicialmente, acreditava-se que IFN-gama contribuísse para indução desta conversão, no entanto, descobriu-se que esta citocina atuava na inibição do estágio proliferativo do parasito e não no processo de estágio-conversão (Jones cols., 1975). Utilizando-se culturas primárias de astrócitos, Jones e cols. (1986)

reforçam que a presença de IFN-gama definitivamente não induz à formação de cistos em cultura, mas sim que esta citocina preveniu a lise celular pelas formas multiplicativas rápidas do *Toxoplasma*, permitindo desta forma a persistência do parasito em cultura por períodos mais longos. Apesar da imunidade humoral também ter um papel importante na infecção, a resposta celular IFN-dependente também é crucial na resistência do hospedeiro contra o parasito (Suzuki, 2002). O IFN-gama tem a capacidade de ativar macrófagos *in vitro* (Murray e cols., 1985; Black e cols., 1987) e *in vivo* (McCabe e cols., 1984) e macrófagos humanos inibem ou matam o parasito (Nathan e cols., 1985; Black e cols., 1987), tendo um papel importantíssimo na defesa do hospedeiro (Suzuki e cols., 1988). Estudos mais aprofundados devem ser desenvolvidos para o entendimento desta participação desempenhada pelas CME ativadas por LPS, em presença de IFN-gama exógeno, inibindo a conversão do *Toxoplasma*. Interessante seria avaliar a atividade toxoplasmacida pela CME, quantificando a proliferação do parasito nestas condições. Além disso, avaliar a produção de IFN endógeno pela CME e o balanço desta citocina antes e depois da infecção em presença de IFN exógeno, seria um dos primeiros passos para inferir o papel desta citocina na proteção das células musculares, impedindo a conversão e, conseqüentemente, o estabelecimento de uma infecção crônica pelo parasito. Apesar dos nossos dados referentes a conversão do *Toxoplasma* em presença de IFN exógeno, serem ainda preliminares, eles apontam para sua modulação negativa sobre a célula muscular na conversão do parasito e reforçam ainda mais a nossa hipótese de que o intrigante processo de diferenciação não deve ser uma resposta a estresses exógenos, e sim diretamente relacionada à célula hospedeira.

Os taquizoítos são os estágios do *Toxoplasma* mais extensivamente estudados e numerosos marcadores estão disponíveis. Como exemplo de moléculas especificamente expressas por taquizoítos podemos citar as isoenzimas ENO2 e LDH1, enquanto os bradizoítos expressam exclusivamente ENO1 e LDH2. Um anticorpo adicional, além dos já citados, foi também CC2 que reconhece uma proteína da parede do cisto (Ferguson, 2004). Uma outra abordagem metodológica utilizada na presente tese foi a técnica de RT-PCR em tempo real nas CMEs para avaliação da expressão relativa de genes específicos para cada estágio do *Toxoplasma*. A técnica de RT-PCR em tempo real é o método mais adequado para detecção e quantificação de níveis de expressão gênica oferecendo alta sensibilidade e reprodutibilidade (Pfaffl e cols., 2001). A expressão relativa dos genes ENO1 (específico de bradizoítos) e ENO2 (específico de taquizoítos) foi

baseada na expressão relativa para o gene para tubulina, com o objetivo de se considerar o aumento de mRNA devido a multiplicação do parasito ao longo da cinética e/ou por qualquer diferença relativa a isolamento de mRNA de amostras individuais. O gene ENO2 não apresentou grandes alterações durante a cinética de infecção. Em compensação, os níveis relativos a expressão do gene ENO1 aumentou continuamente ao longo dos seis dias de infecção, o que ratifica os altos níveis de estágio-conversão espontânea observados nas CMEs por imunofluorescência.

Cistos teciduais de *T. gondii* são preferencialmente encontrados no sistema nervoso central incluindo a retina e a musculatura esquelética de animais infectados (Dubey e col., 1998; Dzierszinski e cols., 2007). Um tropismo celular deste tipo deve resultar em parte de uma resposta antiparasítica inadequada ou reduzida nestes órgãos. O número de cistos no cérebro de camundongos depende da carga genética do MHC (Brown e McLeod, 1990), confirmando seu papel do MHC nos mecanismos de defesa imune na regulação do desenvolvimento dos cistos no cérebro. No entanto, fatores que determinam uma sobrevivência de longo termo do *T. gondii* no tecido muscular ainda não foi delineado. Nossos dados sugerem que deva existir um fator de impacto considerável tipo célula-específico, pelo menos como pré-requisito para a persistência do parasito, isto é, de bradizoítos na musculatura esquelética. Estudos mais aprofundados devem ser estabelecidos para se conhecer a extensão com que fatores imunológicos também regulam o número de cistos formados na musculatura esquelética. Em conclusão, células musculares esqueléticas proporcionam um nicho que dispara prontamente o desenvolvimento de bradizoítos sem a necessidade de estímulos de fatores de estresse externos. Nossa hipótese é que este fato explicaria, pelo menos em parte, a persistência preferencial nos tecidos de musculatura esquelética, *in vivo*.

Esse modelo celular poderá contribuir para uma melhor compreensão da biologia celular e molecular da conversão e da cistogênese do *Toxoplasma*, fornecendo subsídios: (i) que possam direcionar vias alternativas para uma quimioterapia de pacientes com toxoplasmose e, (ii) que levem à interrupção de uma das principais vias de transmissão do parasito através da ingestão de carne crua ou mal cozida entre os humanos.

O artigo de revisão intitulado "Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*" (Anexo 2), teve como referência os experimentos empregando uma grande diversidade de tipos celulares, que

exploraram as condições de indução da diferenciação: (i) através da manutenção das culturas em pH alcalino, (ii) pela adição de citocinas às culturas, (iii) sob condições de estresse nutricional. Os dados foram tabulados, considerando-se as condições de estresses mais conhecidas e destacando, por outro lado, os contrastes resultantes do sucesso e da efetividade de cada sistema em formar bradizoítos *in vitro*. O principal foco da revisão foi discutir a questão do papel das células hospedeiras na contribuição ou na interferência do processo de diferenciação do parasito e finalmente resgatar a questão de que o tipo celular também possa ser um fator determinante importante neste intrigante processo.

CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

- A expressão de proteínas músculo-específicas, tais como, Myf5, MyoD e desmina em CME são coincidentes com os diferentes estágios da miogênese reproduzidos *in vitro*, a partir de mioblastos isolados de embriões de camundongos;
- Altas taxas de diferenciação de taquizoítos-bradizoítos de *T. gondii* ocorrem espontaneamente em CMEs oriundas de cultura primária ou de linhagem celular indicando que a estágio-conversão do *Toxoplasma* ocorre independente de estímulos exógenos;
- O aumento da expressão de ENO1 (uma enolase específica ao estágio bradizoíta do *Toxoplasma*) em culturas infectadas por taquizoítos de *T. gondii* em associação com a expressão de proteína bradizoíta específico por imunofluorescência corroboram a sugestão de que a estágio-conversão espontânea ocorra em CME;
- Células de linhagem de fibroblasto mostraram um baixo percentual de vacúolos contendo bradizoítos de *Toxoplasma*, a partir de infecção com taquizoítos indicando que o tipo celular é determinante para disparar a conversão em bradizoítos;
- CMEs infectadas com taquizoítos de *T. gondii* e incubadas com IFN gama exógeno em presença de LPS não induziram a conversão dos parasitos em bradizoítos sugerindo que essa estratégia não se aplica em CME;
- Em resumo, as evidências de que a diferenciação para bradizoítos a partir de taquizoítos não necessita de fatores externos de estresse em CME, sugere que: (i) a estágio-conversão do *Toxoplasma* não seja uma resposta a fatores de estresse, e sim esteja relacionada ao tipo celular em que o parasito se encontra para desenvolver seu ciclo, e que (ii) fatores intrínsecos inerentes do tipo celular podem ser um pré-requisito para a conversão e/ou persistência do parasito no tecido muscular.

BIBLIOGRAFIA

VIII. Bibliografia

- Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. PLoS Pathog 2005; 1 e 17.
- Ascenzi P, Bocedi A, Gradoni L. Do neuroglobin and myoglobin protect *Toxoplasma gondii* from nitrosative stress? IUBMB Life. 2005;57(10):689-91.
- Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Orefice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. Emerg Infect Dis 2003;9:55–62.
- Barbosa HS, Pereira MCS, Meirelles MNL. Protocolos de culturas primárias. Cap. 18.2 In: Doença de Chagas:Manual para experimentação animal, Tania Araújo-Jorge & Solange Lisboa de Castro (org), Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ , 2000;pp 297-313.
- Barbosa HS, Silva MFF, Guimarães EV, Carvalho L, Rodrigues RM. Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear localization. J Parasitol 2005;91:182-184.
- Barbosa HS. Why studies on invasion of host cell by *Trypanosoma cruzi* using established cell lines or primary cell cultures give conflicting results? Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94 (Suppl 1):153-4.
- Benenson MW, Takafuji ET, Lemon SM, Greenup RL, Sulzer AJ. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. N Engl J Med 1982;307(11):666-9.
- Berdoy M, Webster JP, Macdonald DW. Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. Proc Biol Sci. 2000 Aug 7;267(1452):1591-4.
- Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. Semin Cell Dev Biol. 2005;16:585-95. Review
- Bhopale GM. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. Microbes Infect. 2003 Apr;5(5):457-62. Review.
- Biggs BA, Hewish M, Kent S, Hayes K, Crowe SM. HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii*. J Immunol. 1995 Jun 1;154(11):6132-9.

- Black CM, Catterall JR, Remington JS. In vivo and in vitro activation of alveolar macrophages by recombinant interferon-gamma. *J Immunol*. 1987 Jan 15;138(2):491-5.
- Black MW, Arrizabalaga G, Boothroyd JC. Ionophore-resistant mutants of *Toxoplasma gondii* reveal host cell permeabilization as an early event in egress. *Mol Cell Biol* 2000;24:9399-408.
- Black MW, Boothroyd JC. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:607-23.
- 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* 1993b;79:485-7.
- Bohne W, Heesemann J, Gross U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect Immun* 1993a;61:1141-5.
- Bohne W, Heesemann J, Gross U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect Immun* 1994;62:1761-7.
- Bohne W, Holpert M, Gross U. Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology* 1999;201:248-54.
- Bohne W, Parmley SF, Yang S, Gross U. Bradyzoite-specific genes. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;219:81-91.
- Bohne W, Roos DS. Stage-specific expression of a selectable marker in *Toxoplasma gondii* permits selective inhibition of either tachyzoites or bradyzoites. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 88: 115-126.
- Bohne W, Roos DS. Stage-specific expression of a selectable marker in *Toxoplasma gondii* permits selective inhibition of either tachyzoites or bradyzoites. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 88: 115-126.
- 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* 1997;352(1359):1347-54.

- Boothroyd JC, Dubremetz JF. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Jan;6(1):79-88. Review.
- Boothroyd JC, Grigg ME. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol* 2002;5(4):438-42.
- Boothroyd JC, Hehl A, Knoll LJ, Manger ID. The surface of *Toxoplasma*: more and less. *Int J Parasitol*. 1998 Jan;28(1):3-9. Review.
- Brown CR, McLeod R. Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol*. 1990 Nov 15;145(10):3438-41.
- Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D, Relaix F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat*. 2003 Jan;202(1):59-68. Review.
- Buckingham M. Muscle differentiation. Which myogenic factors make muscle? *Curr Biol*. 1994 Jan 1;4(1):61-3.
- Buckingham M. Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. *C R Biol*. 2007 Jun-Jul;330(6-7):530-3. Epub 2007 Jun 13. Review.
- Bugnard E, Zaal KJ, Ralston E. Reorganization of microtubule nucleation during muscle differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2005;60:1-13.
- Bugnard E, Zaal KJ, Ralston E. Reorganization of microtubule nucleation during muscle differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2005;60:1-13.
- Capetanaki Y, Milner DJ. Desmin cytoskeleton in muscle integrity and function. *Subcell Biochem* 1998;31:463-495. Review.
- Carruthers VB, Giddings OK, Sibley LD. Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cell Microbiol* 1999a;1(3):225-35.
- Carruthers VB, Sibley LD. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol* 1999; 31:421-428.
- Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 1997;73:114-23.
- Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop* 2002;81:111-122.
- Carruthers VB. Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. *Int J Parasitol* 2006;36(5):595-600.

- Carvalho L, De Souza W. Carbohydrate-containing molecules found in rhoptries are released during penetration of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* in host cells. *Biocell* 1997;21:25-29.
- Carvalho L, De Souza W. Carbohydrate-containing molecules found in rhoptries are released during penetration of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* in host cells. *Biocell* 1997;21:25-29.
- Carvalho L, De Souza W. Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during internalization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *J Protozool* 1989;36:164-170.
- Carvalho L, De Souza W. Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during internalization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *J Protozool* 1989;36:164-170.
- Carvalho L, De Souza, W. Internalization of surface anionic sites and phagosome-lysosome fusion during interaction of *Toxoplasma gondii* with macrophages. *Eur J Cell Biol* 1990;51:211-219.
- Carvalho L, Yan CY, De Souza W. The effect of various digestive enzymes on the interaction of *Toxoplasma gondii* with macrophage. *Parasitol Res* 1993;79:114-118.
- Carvalho TM, Ferreira AG, Coimbra ES, Rosestolato CT, De Souza W. Distribution of cytoskeletal structures and organelles of the host cell during evolution of the intracellular parasitism by *Trypanosoma cruzi*. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1999; 31:325-333.
- Chang WS, Serikawa K, Allen K, Bentley D. Disruption of pioneer growth cone guidance in vivo by removal of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored cell surface proteins. *Development* 1992;114:507-519.
- Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004;84:209-238. Review.
- Charron AJ, Sibley LD. Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic* 2004;5:855-867.

- Chen L, Burgunder JM. In vitro developmental expression of dystroglycan and laminin- α 2 in human skeletal muscle. *Cell Biol Int* 2005;29:506-513.
- Choi J, Costa ML, Mermelstein CS, Chagas C, Holtzer S, Holtzer H. MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7988-7992.
- Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002;18:637-706. Review.
- Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003;422(6927):37-44.
- Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ* 2000;321:142-147.
- Coppens I, Dunn JD, Romano JD, Pypaert M, Zhang H, Boothroyd JC, Joiner KA. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell* 2006;125(2):261-74.
- Coppin A, Dzierszynski 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* 2003;85(3-4):353-61.
- Costa ML, Escaleira R, Cataldo A, Oliveira F, Mermelstein CS. Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:1819-1830. Review.
- Costa ML, Escaleira R, Cataldo A, Oliveira F, Mermelstein CS. Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:1819-1830. Review.
- Costa ML, Escaleira R, Manasfi M, de Souza LF, Mermelstein CS. Cytoskeletal and cellular adhesion proteins in zebrafish (*Danio rerio*) myogenesis. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:1117-1120.

- Costa ML, Escaleira R, Manasfi M, de Souza LF, Mermelstein CS. Cytoskeletal and cellular adhesion proteins in zebrafish (*Danio rerio*) myogenesis. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:1117-1120.
- Costa ML, Escaleira RC, Rodrigues VB, Manasfi M, Mermelstein CS. Some distinctive features of zebrafish myogenesis based on unexpected distributions of the muscle cytoskeletal proteins actin, myosin, desmin, alpha-actinin, troponin and titin. *Mech Dev* 2002;116:95-104.
- Costa ML, Escaleira RC, Rodrigues VB, Manasfi M, Mermelstein CS. Some distinctive features of zebrafish myogenesis based on unexpected distributions of the muscle cytoskeletal proteins actin, myosin, desmin, alpha-actinin, troponin and titin. *Mech Dev* 2002;116:95-104.
- Darcy F, Santoro, F. Toxoplasmosis. In: Kierszenbaum F (ed), *Parasitic infections and the immune system*. 1994;163-200. Academic Press, Inc.
- Darde ML, Bouteille B, Leboutet MJ, Loubet A, Pestre-Alexandre M. *Toxoplasma gondii*: ultrastructural study of cystic formations observed in human fibroblast culture. *Ann Parasitol Hum Comp* 1989;64:403-11.
- De Carvalho L, De Souza W. Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during internalization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *J Protozool* 1989;36:164-70.
- De Carvalho L, Yan CY, De Souza W. The effect of various digestive enzymes on the interaction of *Toxoplasma gondii* with macrophage. *Parasitol Res* 1993;79(2):114-8.
- De Carvalho TU, Souto-Padron T, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: surface charge and freeze-fracture of amastigotes. *Exp Parasitol* 1985;59:12-23.
- De Haan RL. Development of pacemaker tissue in the embryonic chick heart cells in tissue culture. *Ann N Y Acad Sci* 1965;127:7-18.
- De Lucca C. Effects of mode of culture and nutrient medium on cyclic variations in enzyme activities of mammalian cells cultured *in vitro*. *Exp Cell Res* 1966;43:39-50.
- De Melo EJ, Carvalho TM, De Souza W. Behaviour of microtubules in cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Biocell*. 2001;25(1):53-9.

- De Melo EJT, De Souza W. A cytochemistry study of the inner membrane complex of the pellicle of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Res 1997;83:252-256.
- Dedieu S, Poussard S, Mazeret G, Grise F, Dargelos E, Cottin P, Brustis JJ. Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization. Exp Cell Res 2004;292:187-200.
- Delgado, EF, Geesink, GH, Marchello, JA, Goll, DE, Koohmaraie, M. Properties of myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of callipyge and normal sheep. J Anim Sci 2001;79:2097-2107.
- 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 1996;137(1):103-8.
- Derouin F. Anti-toxoplasmosis drugs. Curr Opin Investig Drugs 2001;2:1368-1374.
- Desmonts G, Couvreur J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. N Engl J Med 1974;290(20):1110-6.
- Długońska H, Gatkowska J, Kur J, Gasior A. The vaccines against toxoplasmosis--current status of the studies. Wiad Parazytol. 2007;53(3):195-201. Review.
- Dobrowolski JM, Sibley LD. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. Cell. 1996;84(6):933-9.
- Dodson MV, McFarland DC, Grant AL, Doumit ME, Velleman SG. Extrinsic regulation of domestic animal-derived satellite cells. 1996;13:107-126.
- Dodson MV, McFarland DC, Grant AL, Doumit ME, Velleman SG. Extrinsic regulation of domestic animal-derived satellite cells. 1996;13:107-126.
- Donald RG, Roos DS. Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: a selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Dec 15;90(24):11703-7.
- Downing KH, Nogales E. Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions. Curr Opin Struct Biol. 1998;8:785-791. Review.
- Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Pres Inc 1988;1-122. Boca Raton, Fla.

- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev 1998;11:267-299. Review.
- Dubey JP, Miller S, Powell EC, Anderson WR. Epizootiologic investigations on a sheep farm with *Toxoplasma gondii*-induced abortions. J Am Vet Med Assoc. 1986 Jan 15;188(2):155-8.
- Dubey JP, Murrell KD, Fayer R. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs fed oocysts. Am J Vet Res. 1984 Oct;45(10):1941-3.
- Dubey JP, Shen SK, Kwok OC, Frenkel JK.
- Dubey JP, Speer CA, Shen SK, Kwok OC, Blixt JA. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. J Parasitol 1997;83:870-82.
- Dubey JP. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in caprine livers and public health significance of toxoplasmosis in goats. J Am Vet Med Assoc. 1980 Dec 15;177(12):1203-7.
- Dubey JP. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of equids fed oocysts. Am J Vet Res. 1985 Aug;46(8):1753-4.
- Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 1998a;28:1019-24.
- Dubey JP. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. J Eukaryot Microbiol 1997;44:592-602.
- Dubey JP. Isolation of encysted *Toxoplasma gondii* from muscles of mule deer in Montana. J Am Vet Med Assoc. 1982 Dec 15;181(12):1535.
- Dubey JP. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. Am J Vet Res 1988;49:910-3.
- Dubey JP. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. J Parasitol 2001;87:215-19.
- Dubey JP. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. Parasitology 1998a;116(pt 1):43-50.

- Dubey JP. *Toxoplasma gondii* infection in rodents and insectivores from Montana. J Wildl Dis. 1983 Apr;19(2):149-50.
- Dubey JP. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. J Parasitol 1998b;84:862-865.
- Dubey JP. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidian of humans and animals. In: Kreier JP, editor. Parasitic protozoa, New York: Academic Press Inc; 1993. v. 6. p. 1-158.
- Dubey JP. Unexpected oocyst shedding by cats fed *Toxoplasma gondii* tachyzoites: in vivo stage conversion and strain variation. Vet Parasitol 2005;133:289–98.
- Dubremetz JF, Achbarou A, Bermudes D, Joiner KA. Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. Parasitol Res 1993;79(5):402-8.
- Dzierszynski F, Nishi M, Ouko L, Roos DS. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. Eukaryot Cell 2004;3(4):992-1003.
- Dzierszynski F, Pepper M, Stumhofer JS, LaRosa DF, Wilson EH, Turka LA, Halonen SK, Hunter CA, Roos DS. Presentation of *Toxoplasma gondii* antigens via the endogenous major histocompatibility complex class I pathway in nonprofessional and professional antigen-presenting cells. Infect Immun. 2007 ;75(11):5200-9.
- Dzierszynski 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. 1999 27;274(35):24888-95.
- Egea N, Lang-Unnasch N. Phylogeny of the large extrachromosomal DNA of organisms in the phylum Apicomplexa J Eukaryot Microbiol. 1995;42(6):679-84. Erratum in: J Eukaryot Microbiol. 1996 Mar-Apr;43(2):158.
- Ellis J, Sinclair D, Morrison D. Microarrays and stage conversion in *Toxoplasma gondii*. Trends Parasitol. 2004 Jun;20(6):288-95. Review.
- Ferguson DJ. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? Trends Parasitol. 2002 Aug;18(8):355-9.
- Ferguson DJ. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. Int J Parasitol 2004;34(3):347-360.

- Ferreira-Da-Silva, MF; Barbosa, HS; Gross, U.; Lueder CGK. Stress-related and spontaneous differentiation of *Toxoplasma gondii* Mol. Byossistem, 2008. DOI 10.1039/b800520f.
- Foulon W, Pinon JM, Stray-Pedersen B, Pollak A, Lappalainen M, Decoster A, Villena I, Jenum PA, Hayde M, Naessens A. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: a multicenter evaluation of different diagnostic parameters. Am J Obstet Gynecol. 1999 Oct;181(4):843-7.
- Fox BA, Gigley JP, Bzik DJ. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. Int J Parasitol. 2004
- Frenkel JK, Dubey JP, Hoff RL. Loss of stages after continuous passage of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni*. J Protozool 1976;23(3):421-4.
- Frenkel JK. Letter: Cytomegalovirus infection and toxoplasma. Am J Dis Child 1973;126:860-1.
- Frenkel JK. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. J Am Vet Med Assoc 1990;196:233-40.
- Frenkel JK.. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. J Am Vet Med Assoc. 1990 Jan 15;196(2):233-40.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. Eur J Immunol. 1992 Oct;22(10):2501-6.
- Gherardi R, Baudrimont M, Lionnet F, Salord JM, Duvivier C, Michon C, Wolff M, Marche C. Skeletal muscle toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: a clinical and pathological study. Ann Neurol 1992; 32:535-542.
- Gross U, Bohne W, Lüder CGK, Lugert R, Seeber F, Dittrich C, Pohl F, Ferguson DJP. Regulation of developmental differentiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. J Eukaryot Microbiol 1996;43:114S-116S.
- Gross U, Bormuth H, Gaissmaier C, Dittrich C, Krenn V, Bohne W, Ferguson DJ. Monoclonal rat antibodies directed against *Toxoplasma gondii* suitable for

- studying tachyzoite-bradyzoite interconversion *in vivo*. Clin Diagn Lab Immunol 1995;2:542-48.
- Gross U, Kempf MC, Seeber F, Lüder CG, Lugert R, Bohne W. Reactivation of chronic toxoplasmosis: is there a link to strain-specific differences in the parasite? Behring Inst Mitt. 1997 Mar;(99):97-106. Review.
- Gross U, Pohl F. Influence of antimicrobial agents on replication and stage conversion of *Toxoplasma gondii*. Curr Top Microbiol Immunol 1996;219:235-45.
- Guimarães EV, Carvalho L, Barbosa HS. An Alternative technique to reveal polysaccharides in *Toxoplasma gondii* tissue cysts. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003;98(7):915-7.
- Guimarães EV, de Carvalho L, Barbosa HS. Primary culture of skeletal muscle cells as a model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis. J Parasitol. 2008 Feb;94(1):72-83.
- Haas TA, Plow EF. Integrin-ligand interactions: a year in review. Curr Opin Cell Biol. 1994 Oct;6(5):656-62. Review.
- Haas TA, Plow EF. Integrin-ligand interactions: a year in review. Curr Opin Cell Biol. 1994;6:656-662. Review.
- Harboe A, Erichsen S., Acta Pathol Microbiol Scand. 1954; 35(5):495-502. Toxoplasmosis in chickens. 3. Attempts to provoke a systemic disease in chickens by infection with a chicken strain and a human strain of toxoplasma.
- Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect. 2002 Oct;8(10):634-40. Review.
- Hoare CA. The developmental stages of *Toxoplasma*. J Trop Med Hyg. 1972 Mar;75(3):56-8.
- Hoff RL, Dubey JP, Behbehani AM, Frenkel JK. *Toxoplasma gondii* cysts in cell culture: new biologic evidence. J Parasitol 1977;63:1121-4.
- Hogan MJ, Yoneda C, Feeney L, Zweigart P, LEWIS A.. Morphology and culture of *Toxoplasma*. Trans Am Ophthalmol Soc. 1960;58:167-87.
- Ho-Yen DO, Joss AW Congenital toxoplasmosis. BMJ 1992;305:651-652.
- Inestrosa NC. Differentiation of skeletal muscle cells in culture. Cell Struct Funct 1989;28:55-105.
- Infection and immunity with the RH strain of *Toxoplasma gondii* in rats and mice. J Parasitol. 1999 Aug;85(4):657-62.

- Jackson MH, Hutchison WM. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv Parasitol* 1989;28: 55-105.
- Jacobs L. *Toxoplasma* and toxoplasmosis. *Adv Parasitol* 1967;5:1-45.
- Jerome ME, Radke JR, Bohne W, Roos DS, White MW. *Toxoplasma gondii* bradyzoites form spontaneously during sporozoite-initiated development. *Infect Immun*. 1998 Oct;66(10):4838-44.
- Joiner KA, Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. *Infect Immun*. 1993 Apr;61(4):1169-72. Review.
- Joiner KA, Roos DS. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J Cell Biol* 2002;157:557-63.
- Jones TC, Len L, Hirsch JG. Assessment in vitro of immunity against *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med*. 1975 Feb 1;141(2):466-82.
- Jones TC, Bienz KA, Erb P. In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. *Infect Immun* 1986;51:147-56.
- Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R. Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv* 2001;56:296-305.
- Keeley A, Soldati D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol* 2004;14(10):528-32.
- Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol* 2004;34(3):423-32.
- Kim K, Soldati D, Boothroyd JC. Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science*. 1993 Nov 5;262(5135):911-4.
- Kim K. Time to screen for congenital toxoplasmosis? *Clin Infect Dis*. 2006 May 15;42(10):1395-7. Epub 2006 Apr 11.
- Köhler S. Multi-membrane-bound structures of Apicomplexa: II. the ovoid mitochondrial cytoplasmic (OMC) complex of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Parasitol Res*. 2006 Mar;98(4):355-69.
- Köhler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJ, Palmer JD, Roos DS. A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*. 1997 Mar 7;275(5305):1485-9.

- Konigsberg IR, Sollmann PA, Mixer LO. The duration of the terminal G1 of fusing myoblasts. *Dev Biol* 1978;63:11-26.
- Konigsberg IR. Clonal analysis of myogenesis. *Science* 1963;140:1273-1284.
- Lane A, Soete M, Dubremetz JF, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: appearance of specific markers during the development of tissue cysts *in vitro*. *Parasitol Res* 1996;82:340-6.
- Lindsay DS, Dubey JP, Blagburn BL, Toivio-Kinnucan M. Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. *J Parasitol* 1991;77:126-32.
- 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* 1993a;54:1663-7.
- Lindsay DS, Toivio-Kinnucan MA, Blagburn BL. Ultrastructural determination of cystogenesis by various *Toxoplasma gondii* isolates in cell culture. *J Parasitol* 1993b;79:289-92.
- Lüder CG, Giraldo-Velasquez M, Sendtner M, Gross U. *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *Exp Parasitol*. 1999; 93:23-32.
- Lüder CG, Gross U. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;289:219-37. Review
- Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 1992;15:211-22.
- Luft BJ, Pedrotti PW, Engleman EG, Remington JS. Induction of antigen-specific suppressor T cells during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis*. 1987 May;155(5):1033-7.
- McHugh TD, Gbewonyo A, Johnson JD, Holliman RE, Butcher PD. Development of an *in vitro* model of *Toxoplasma gondii* cyst formation. *FEMS Microbiol Lett* 1993;114:325-32.
- McHugh TD, Holliman RE, Butcher PD. The *in vitro* model of tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today* 1994;(7):281-5.

- Mehlhorn H, Frenkel JK. Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris*, and *Hammondia hammondi* in skeletal muscle of mice. *J Parasitol* 1980;66:59-67.
- Sanger JW, Kang S, Siebrands CC, Freeman N, Du A, Wang J, Stout AL, Sanger JM. How to build a myofibril. *J Muscle Res Cell Motil* 2006;26:343-354.
- Molestina RE, Sinai AP. Detection of a novel parasite kinase activity at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane capable of phosphorylating host I κ B α . *Cell Microbiol.* 2005 Mar;7(3):351-62.
- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004;363(9425):1965-76.
- Mordue DG, Desai N, Dustin M, Sibley LD. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med* 1999;190:1783-1792.
- Mordue DG, Desai N, Dustin M, Sibley LD. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med* 1999;190:1783-1792.
- Morrisette NS, Sibley LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002 Mar;66(1):21-38; table of contents. Review.
- Nichols BA, Chiappino ML. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J Protozool* 1987;34(2):217-26.
- Nichols BA, O'Connor GR. Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. *Lab Invest* 1981;44:324-335.
- Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci* 1908;147:763-6.
- Payne TM, Molestina RE, Sinai AP (2003) Inhibition of caspase activation and a requirement for NF- κ B function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. *J Cell Sci* 116: 4345–4358.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1;30(9):e36.

- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45.
- Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors invertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:747-83. Review.
- Radke JR, Behnke MS, Mackey AJ, Radke JB, Roos DS, White MW. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. *BMC Biol.* 2005 Dec 2;3:26.
- Radke JR, Donald RG, Eibs A, Jerome ME, Behnke MS, Liberator P, White MW. Changes in the expression of human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma gondii* growth and development. *PLoS Pathog.* 2006 Oct;2(10):e105.
- Radke JR, Guerini MN, Jerome M, White MW. A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 131(2):119-27.
- Remington JS, Cavanaugh EN. Isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain. *N Engl J Med* 1965;273:1308-1310.
- Remington JS, Gentry LO. Acquired toxoplasmosis: infection versus disease. *Ann NY Acad Sci* 1970;174:1006–17.
- Remington JS, McLeod R, Desmonts, G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1995. p. 140-267.
- Roos DS, Crawford MJ, Donald RG, Kissinger JC, Klimczak LJ, Striepen B. Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid. *Curr Opin Microbiol.* 1999 Aug;2(4):426-32. Review.
- Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet.* 2000 Jan;57(1):16-25. Review.
- Sarciron ME, Gherardi A. Cytokines involved in Toxoplasmic encephalitis. *Scand J Immunol.* 2000 Dec;52(6):534-43. Review.
- Schlüter D, Kwok LY, Lütjen S, Soltek S, Hoffmann S, Körner H, Deckert M. Both lymphotoxin-alpha and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. *J Immunol.* 2003 Jun 15;170(12):6172-82.
- Schlüter D, Deckert M, Hof H, Frei K. *Toxoplasma gondii* infection of neurons induces neuronal cytokine and chemokine production, but gamma interferon-

and tumor necrosis factor-stimulated neurons fail to inhibit the invasion and growth of *T. gondii*. *Infect Immun*. 2001 Dec;69(12):7889-93.

- Seeber F. Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2003 Jun;3(2):99-109. Review.
- Shainberg A, Yagil G, Yaffe D. Control of myogenesis *in vitro* by Ca^{++} concentration in nutritional medium. *Exptl Cell Res* 1969;58:163-167.
- Sinai AP, Payne TM, Carmen JC, Hardi L, Watson SJ, et al. (2004) Mechanisms underlying the manipulation of host apoptotic pathways by *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 34: 381–391.
- Soète M, Camus D, Dubremetz JF. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii in vitro*. *Exp Parasitol* 1994;78:361-70.
- Soète M, Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion *in vitro*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;219:76-80.
- Soète M, Fortier B, Camus D, Dubremetz JF. *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. *Exp Parasitol* 1993;76:259-264.
- Speer CA, Dubey JP. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *Int J Parasitol* 2005;35(2):193-206.
- Stanley AC, Buxton D, Innes EA, Huntley JF Intranasal immunisation with *Toxoplasma gondii* tachyzoite antigen encapsulated into PLG microspheres induces humoral and cell-mediated immunity in sheep. *Vaccine*. 2004 Sep 28;22(29-30):3929-41...
- Striepen B, Jordan CN, Reiff S, van Dooren GG. Building the perfect parasite: cell division in apicomplexa. *PLoS Pathog*. 2007 Jun;3(6):e78. Review.
- Suzuki Y, Conley FK, Remington JS. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J Immunol* 1989;143:2045-50.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000;30: 1217-58.

- Tomavo S, Fortier B, Soete M, Ansel C, Camus D, Dubremetz JF. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 1991;59:3750-3.
- Tuckwell DS, Humphries MJ. Molecular and cellular biology of integrins. *CriRev Oncol Hematol* 1993;15:149-171. Review.
- Wan KL, Carruthers VB, Sibley LD, Ajioka JW. Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 84(2): 203-214.
- Webster JP. The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. *Schizophr Bull.* 2007 May;33(3):752-6. Epub 2007 Jan 11. Review.
- Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci* 2000;5:D391-405.
- Weiss LM, Laplace D, Takvorian PM, Tanowitz HB, Cali A, Wittner M. Cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *J Eukaryot Microbiol* 1995;42:150-7.
- Witting PA. Learning capacity and memory of normal and *Toxoplasma*-infected laboratory rats and mice. *Z Parasitenkd.* 1979;61(1):29-51.
- Yablonka-Reuveni Z, Day K, Vine A, Shefer G. Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. *J Anim Sci.* 2008 Apr;86(14 Suppl):E207-16. Epub 2007 Sep 18. Review.
- Yaffe D, Saxel O. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation* 1977; 7(3): 159-166.
- Yaffe D. Rat skeletal muscle cells. In: Kruse Jr PF, Patterson Jr MK, editors. *Tissue culture: methods and applications*. New York: Ac. Press; 1973. p. 106-114.
- Yaffe D. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 61(2): 477-483.
- Yahiaoui B, Dzierszynski F, Bernigaud A, Slomianny C, Camus D, Tomavo S. Isolation and characterization of a subtractive library enriched for developmentally regulated transcripts expressed during encystation of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 1999 Apr 30;99(2):223-35.
- Zhang YW, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: reactivity of murine sera against tachyzoite and cyst antigens via FAST-ELISA. *Int J Parasitol.* 1995 May;25(5):637-40.

ANEXOS

ANEXO I

1 SHORT COMMUNICATION

2

3 ***Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion in skeletal muscle cells**
4 **in the absence of exogenous stress factors**

5

6

7

8

9 **Marialice da Fonseca Ferreira-da-Silva^{1,2}, Anna C. Takács¹, Helene S. Barbosa², Uwe**
10 **Gross¹, and Carsten G. K. Lüder^{1*}**

11

12 ¹Institute for Medical Microbiology, Georg-August-University, Kreuzberggring 57, 37075

13 Göttingen, Germany; ²Laboratory of Structural Biology, Oswaldo Cruz Institut, Oswaldo Cruz

14 Foundation, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

15

16

17

18

19

20

21

22

23 *Corresponding author: Carsten G. K. Lüder, Institute for Medical Microbiology, Georg-August-

24 University, Kreuzberggring 57, 37075 Göttingen, Germany. Tel.: +49-551-395869; Fax: +49-551-

25 395861; e-mail: clueder@gwdg.de

26

27 **Abstract**

28 *Toxoplasma gondii* is one of the most common eukaryotic parasites and an important
29 opportunistic pathogen of humans. The interconversion from proliferative tachyzoites into
30 quiescent encysted bradyzoites plays pivotal roles in the lifelong persistence of *T. gondii* in its
31 host and the pathogenesis of toxoplasmosis. Stage conversion and persistence in skeletal muscle
32 tissue may be particularly important for the food-borne transmission of *T. gondii* to humans via
33 raw or undercooked meat products. Here we have followed the transition of tachyzoites to
34 bradyzoites after infection of skeletal muscle cells (SkMC). Primary murine myoblasts were
35 differentiated to multinucleated syncytial myotubes that displayed regular contractions in vitro
36 and expressed myogenic markers Myf5 and MyoD. Tachyzoites of *T. gondii* invaded SkMC
37 within 4 hours of infection and started to replicate within 24 hours of infection. Remarkably,
38 intracellular tachyzoites readily differentiated to bradyzoites in SkMC without the need of
39 exogenous stress factors. Double immunofluorescence labelling revealed significantly higher
40 percentages of bradyzoite-containing vacuoles in SkMC than in murine fibroblasts at 24 hours
41 until 6 days after infection. Furthermore, transcript levels of bradyzoite-specific ENO1 but not
42 tachyzoite-specific ENO2 strongly increased in *T. gondii*-infected SkMC until 6 days of
43 infection. These findings indicate that the commitment of *T. gondii* to differentiate to
44 bradyzoites in SkMC does not require exogenous stress factors but could be rather regulated by
45 cell-type specific factors.

46

47

48 **Key words:** *Toxoplasma gondii*, skeletal muscle cell, stage conversion, bradyzoite, parasite
49 persistence.

50

51

52

53 **Introduction**

54 The differentiation of fast-replicating tachyzoites of the intracellular protozoan parasite
55 *Toxoplasma gondii* into the dormant bradyzoite stage plays pivotal roles in the formation of
56 tissue cysts, the life-long persistence of viable parasites in the host, and the transmission between
57 mammalian and avian hosts including humans (Tenter et al., 2000). It is also a major prerequisite
58 for life-threatening diseases due to *T. gondii*, e.g. reactivated toxoplasmosis in
59 immunocompromized patients (Montoya and Liesenfeld, 2004). The early events of the stage
60 conversion are thought to be of critical importance, during which the expression of tachyzoite-
61 specific genes is switched off and that of bradyzoite-specific ones starts to be up-regulated
62 (Tomavo and Weiss, 2007). In vitro models of the tachyzoite-bradyzoite differentiation have
63 been established using a variety of stress conditions including treatment of host cells with
64 gamma interferon or mitochondrial inhibitors (Bohne et al, 1994), or by employing alkaline pH
65 or high temperature (Soète et al., 1994). Although the employment of artificial stress conditions,
66 e.g. alkaline pH considerably facilitated analyses of the process of *Toxoplasma* stage conversion
67 and underlying mechanisms, we, nevertheless, have to admit that it may not mimic those
68 conditions required for stage conversion during the natural course of infection.

69 Tissue cysts containing bradyzoites of *T. gondii* are found in multiple organs of the host but
70 appear to preferentially develop in neural and muscular tissue (Dubey et al., 1998). The preferred
71 distribution of tissue cysts in brain and muscle may be facilitated by limited or non-canonical
72 immune responses in these tissues (Streilein, 1995; Wiendl et al., 2005). Alternatively, organ or
73 cell type-specific factors which appropriately trigger high levels of stage conversion and tissue
74 cyst formation in some organs but not in others might also be involved. Stage conversion, tissue
75 cyst formation, and host responses have been extensively studied in the brains of infected mice
76 and rats in vivo and in neural cells in vitro. In contrast, the requirements that regulate the
77 development of bradyzoites and tissue cysts in muscle tissue have not yet been investigated.
78 However, this issue is a matter of major concern since cysts in muscle tissue are the prerequisite

79 for transmission of *T. gondii* via the consumption of raw or undercooked meat products to
80 humans. Characterizing the stage conversion of *T. gondii* within myocytes may thus not only
81 further our knowledge on the mechanisms which determine parasite persistence in a
82 physiological type of cell but might also lead to novel strategies to reduce the risk of food-borne
83 transmission to humans. We, therefore, established primary skeletal muscle cells as a model to
84 study the development of *T. gondii* in vitro (Barbosa et al., 2000; Guimaraes et al., 2008).
85 Herein, we demonstrate that *T. gondii* tachyzoites readily convert to bradyzoites in skeletal
86 muscle cells without the need of exogenous stress factors. This suggests cell type-specific
87 mechanisms which may be responsible for the preferential tissue cyst formation of *T. gondii* in
88 muscular tissue.

89

90

91 **Materials and methods**

92

93 **Isolation and culture of skeletal muscle cells**

94 Thigh muscles of 18-20 days old NMRI mouse embryos were minced in Ringer solution and
95 incubated 5-7 times for 5 min each in PBS containing 0.05% trypsin and 0.01% EDTA. Tissue
96 digestion was stopped by the addition of 10% fetal bovine serum in Dulbecco's modified Eagle
97 medium (DMEM) at 4°C. After centrifugation, cells were incubated for 30 min in DMEM
98 supplemented with 15% horse serum, 2% fetal calf serum, 1 mM L-glutamine, 100 U/ml
99 penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Thereafter, non-adherent cells enriched for myoblasts
100 were seeded at 3×10^4 /well in 24-well plates containing coverslips for immunofluorescence
101 analysis and 1×10^5 /well in 6-well plates for RNA extraction. In order to assure long term
102 attachment of skeletal muscle cells, the culture plates had been previously incubated overnight
103 with 0.5 mg/ml poly-L-ornithine hydrobromide in 150 mM boric acid-NaOH, pH 8.3 and then
104 coated with 15 µg/ml mouse laminin for several hours. Cultures were maintained for 4-5 days in

105 order to allow myogenic differentiation (Barbosa et al., 2000). As controls, L929 murine
106 fibroblasts were cultivated in DMEM containing 10% FCS, 1 mM sodium pyruvate, non-
107 essential amino acids, and antibiotics.

108

109 ***Toxoplasma* parasites and infection**

110 Tachyzoites of the mouse-avirulent *T. gondii* type II strain NTE were propagated in L929
111 fibroblasts as host cells. For infection of skeletal muscle cells, tachyzoites were harvested from
112 L929 cocultures after initiation of host cell lysis. Briefly, contaminating host cells were pelleted
113 by centrifugation at $35 \times g$ for 5 min. The supernatant was then centrifuged at $1350 \times g$ for 10
114 min, the parasites were washed once and resuspended in DMEM supplemented with 10% FCS
115 and antibiotics. Skeletal muscle cells and control fibroblasts were infected with *T. gondii*
116 tachyzoites at a parasite to host cell ratio of 1:1.

117

118 **Immunofluorescence staining**

119 In order to determine tachyzoite-bradyzoite interconversion, *T. gondii*-infected cells were fixed
120 at different time points after infection using 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate
121 buffer. Cells were quenched for 10 min in 50 mM NH_4Cl in PBS, pH 7.4 and were then
122 permeabilized for 1 hour with 0.1 mg/ml saponin in PBS containing 1% bovine serum albumin
123 (BSA). Thereafter, cells were incubated simultaneously with CC2 rat monoclonal antibody
124 recognizing bradyzoite-containing but not tachyzoite-containing PVs (Gross et al., 1995) along
125 with polyclonal rabbit anti-*Toxoplasma* serum for 1 hour. Immune complexes were visualized
126 using Cy2-conjugated donkey F(ab')₂ fragments anti-rat IgG and Cy3-conjugated donkey F(ab')₂
127 fragments anti-rabbit IgG. Cells were mounted in Mowiol and analysed by confocal laser
128 scanning microscopy. In order to determine myogenic differentiation, non-infected primary
129 skeletal muscle cells were fixed and processed as described above. Cells were labelled with 5

130 $\mu\text{g/ml}$ mouse anti-MyoD (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) and Cy3-conjugated donkey
 131 F(ab')₂ fragments anti-mouse IgG.

132

133 **Quantitative and semi-quantitative RT-PCR analyses**

134 Total RNA was isolated using the GenElute Miniprep kit (Sigma, Deisenhofen, Germany).

135 Following reverse transcription, serial dilutions of cDNA were amplified by quantitative real-

136 time PCR in a LightCycler with the SYBR Green FastStart DNA Master^{Plus} Set (Roche,

137 Mannheim, Germany) using the following *T. gondii*-specific primer pairs: tubulin forward: 5'-

138 CGCCACGGCOGCTACCTGACT-3'; tubulin reverse: 5'-TACGCGCCTCCTCTGCACCC -

139 3'; ENO2 forward: 5'-AGCGGCGCATCCACTGGCATCTAC-3'; ENO2 reverse: 5'-

140 AACGGGACGGGCATTACCATCTTG-3'; ENO1 forward: 5'-

141 CGAGGGGTGGCTGAAAAAGTATCC-3'; ENO1 reverse 5'-

142 CAGCGAAGGCCACGACAAG-3'. Data were analyzed using the REST-MCS 2006 software

143 (Pfaffl et al., 2002). Briefly, the relative gene expression levels were calculated as the fold

144 change between 4 hours after infection (control) and later time points (sample) using the formula

145 $\text{Ratio} = (E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{Ptarget}}(\text{control-sample})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{Pref}}(\text{control-sample})}$, where the reference gene was tubulin

146 and the target genes were ENO1 (bradyzoite-specific) and ENO2 (tachyzoite-specific).

147 In order to determine myogenic differentiation of skeletal muscle cells in vitro, total RNA was

148 isolated from non-infected cells at 2 days until 10 days after seeding. Ten nanograms of cDNA

149 per sample were used as template for semi-quantitative PCR using the following primers: Myf5

150 forward: 5'-TGAGGGAACAGGTGGAGAAC-3'; Myf5 reverse: 5'-

151 AGCTGGACACGGAGCTTTTA-3'; MyoD1 forward: 5'-TACCCAAGGTGGAGATCCTG-3';

152 MyoD1 reverse: 5'-CATCATGCCATCAGAGCAGT-3'; β -actin forward 5'-

153 GATGACCCAGATCATGTTTGAGAC-3'; β -actin reverse: 5'-

154 TGCTCGAAGTCTAGAGCAACATAG-3'. PCR products were separated in 1% agarose and

155 visualized using ethidium bromide.

156

157 Statistical analysis

158 Results are expressed as means \pm S.E.M. of at least three independent experiments unless
159 otherwise indicated. Significant differences between mean values were identified by Student's *t*-
160 test. In order to avoid false positive results due to multiple comparisons, *P*-values were
161 multiplied with the number of comparisons (Bonferroni correction). Corrected *P* values of less
162 than 0.05 were considered significant.

163

164

165 Results and discussion

166 In order to determine the suitability of primary embryonic skeletal muscle cells for investigating
167 the development and stage conversion of *T. gondii* in muscular tissue, we characterized
168 myogenic differentiation after cultivation of satellite cells from thigh muscles in medium
169 containing 15% horse serum and 2% fetal calf serum. Phase contrast microscopy revealed fusion
170 of myocytes and formation of mature myotubes starting at 4 until 5 days after seeding with
171 considerable numbers of highly elongated myotubes being present at 6 days after seeding (Fig.
172 1A). Sustained myogenic differentiation was confirmed by the presence of multiple mature
173 myotubes with 10-20 nuclei per syncytium expressing the basic helix-loop-helix transcription
174 factor MyoD (Fig. 1C). In addition, regular contractions of such myotubes were observed and
175 recorded by time-lapse video microscopy (data not shown). The kinetics of the expression of
176 specific genes that play pivotal roles in the differentiation and commitment of myoblasts to
177 myotubes revealed that *Myf5* was expressed as early as 2 days after seeding until the end of the
178 observation period (Fig. 1B). In contrast, the expression of MyoD was up-regulated at 4-6 days
179 thus acting downstream of *Myf5* during myogenesis (Tajbakhsh et al., 1997). Together, these
180 data indicated that in vitro differentiated primary skeletal muscle cells represented a valuable
181 model to study the interaction of *T. gondii* with mature myotubes.

182 The infection of skeletal muscle cells with *T. gondii* tachyzoites, i.e. fast-replicating
183 disseminating parasites which are present during acute toxoplasmosis and their subsequent
184 intracellular development and differentiation was followed from 4 hours until 6 days after
185 infection. Immunofluorescence staining and confocal laser scanning microscopy revealed that *T.*
186 *gondii* readily infected skeletal muscle cells as judged by intracellular parasites at 4 hours and
187 subsequent replication (Fig. 2A). A productive infection of murine skeletal muscle cells by *T.*
188 *gondii* tachyzoites was expected due to the active invasion of virtually any mammalian cell type
189 (Dobrowolski and Sibley, 1996). At this early time point following infection, parasites did not
190 react with monoclonal antibody CC2 that specifically label bradyzoite PVs but not tachyzoite
191 PVs (Gross et al., 1995; Ferguson, 2004). Instead, they were strongly positive after
192 counterstaining with polyclonal anti-*Toxoplasma* serum (Fig. 2A; a-c). At 24 hours after
193 infection, multiple *Toxoplasma* vacuoles had already become CC2-reactive (Fig. 2A; d), thereby,
194 indicating onset of conversion to the bradyzoite stage. This is remarkable, since tachyzoites in
195 skeletal muscle cells converted spontaneously to bradyzoites, i.e. in the absence of exogenous
196 stress factors. To date, the development of *T. gondii* bradyzoites has been mainly recognized as a
197 stress-mediated differentiation that leads to metabolic and morphological adaptations of the
198 parasite. This view is indeed sustained by results from various studies showing that stage
199 conversion can be induced in vitro by applying temperature or pH stress (Soète et al., 1994),
200 proinflammatory cytokines or mitochondrial inhibitors (Bohne et al., 1994), or nutrient stress
201 (Fox et al., 2004). Furthermore, bradyzoite development in vivo has been predominantly
202 recognized 2 to 3 weeks after infection, i.e. after induction of a robust anti-*Toxoplasma*
203 immunity (Ferguson and Hutchinson, 1987). However, in primary skeletal muscle cells which
204 had been differentiated to mature myotubes, *T. gondii* tachyzoite-to-bradyzoite differentiation
205 occurred independently of an exogenous stress stimulus. This clearly showed that stage
206 conversion can be triggered by other factors than cellular stress. We also noted that PVs adjacent
207 to bradyzoite-containing vacuoles remained partially non-reactive with mAb CC2 (Fig. 2A; f).

208 Stage conversion of *T. gondii* within skeletal muscle cells was thus a non-synchronized process
209 as previously reported for other host cell types (Bohme et al., 1993; Soete et al., 1993). This
210 further argued against cellular stress encountered by *T. gondii* as a major prerequisite for stage
211 conversion in skeletal muscle cells since the environment for different parasites within a single
212 cell is assumed to be similar. Two days after infection, parasite division had proceeded and
213 vacuoles containing four to sixteen parasites were detected within skeletal muscle cells. From
214 this time point onwards, the reactivity of the CC2 antibody with the matrix of multiple
215 bradyzoite-containing PVs rather than the parasite itself also became apparent (Fig. 2A; g,i). The
216 CC2-reactivity of an increasing number of vacuoles further increased subsequently (Fig. 2A;
217 j,m). In addition, a predominant immunolabelling of material destined for and incorporated into
218 the cyst wall was also clearly visible until 6 days after infection (Fig. 2A; j,m). Using
219 immunofluorescence and immunoelectron microscopy, the CC2 antibody was previously shown
220 to preferentially label the wall of tissue cysts from chronically infected mouse brains, i.e. a
221 characteristic structure of mature *Toxoplasma* tissue cysts (Gross et al., 1995; Ferguson, 2004).
222 Although a definitive antigenic marker for mature tissue cysts is still lacking (Tomavo and
223 Weiss, 2007) the predominant CC2-labelling of a cyst wall-like structure at 6 days after infection
224 (Fig. 2A; m) argued for considerable maturation of the bradyzoite PVs in primary skeletal
225 muscle cells. Recently, we demonstrated ultrastructurally that the cystogenesis of *T. gondii* in
226 skeletal muscle cells is completed within 96 hours after infection with bradyzoites (Guimaraes et
227 al., 2008). These cells thus obviously provide a suitable cellular environment that sustains
228 development of bradyzoites and – at least to a certain extent – tissue cyst maturation without the
229 need of an exogenous stress stimulus.

230 Most importantly, quantification of the *Toxoplasma* PVs in skeletal muscle cells revealed a
231 prominent increase of the percentages of CC2-reactive, i.e. bradyzoite-containing vacuoles
232 within the first day of infection (23.8 ± 3.4 ; Fig. 2B). The increase at this early time point
233 following infection excluded the possibility that it resulted from a loss of CC2-negative vacuoles

234 due to host cell lysis by rapidly dividing tachyzoites rather than enhanced numbers of
235 bradyzoite-containing vacuoles. Tachyzoites of the *T. gondii* NTE strain that we used herein
236 require 48-60 hours before host cell lysis occurs to a significant extent. Likewise, host cell lysis
237 leading to significant numbers of extracellular parasites was not observed until 4 days after
238 infection of skeletal muscle cells (data not shown). The conversion of *T. gondii* to the bradyzoite
239 stage steadily increased during prolonged intracellular infection with $46 \pm 3.5\%$ of the vacuoles
240 being CC2-reactive at 6 days (Fig. 2B). We also observed high rates of *T. gondii* transition to the
241 bradyzoite stage after tachyzoite infection of L6.C10 rat myoblast cells that were differentiated
242 to mature myotubes (data not shown). In order to determine cell-type specific differences in the
243 conversion of *T. gondii* to the bradyzoite stage, L929 murine fibroblasts were infected with
244 tachyzoites of the NTE strain in parallel and stage conversion assessed as described above. The
245 results showed that the percentages of CC2-reactive vacuoles were significantly lower in murine
246 fibroblasts as compared to skeletal muscle cells ($P < 0.01$; Student's *t*-test) and did not exceed
247 20% (Fig. 2B). This strongly supported the view that the host cell type critically impacts the
248 differentiation of *T. gondii* to a dormant life stage.

249 In order to further support the finding that *T. gondii* readily converts to the bradyzoite stage
250 within skeletal muscle cells at the molecular level, transcripts of the stage-specifically expressed
251 genes ENO1 and ENO2 (Dzierszynski et al., 2001) were quantified by real-time RT-PCR.
252 Expression of both genes was calculated relative to the expression of the house-keeping gene *T.*
253 *gondii* tubulin in order to take into account the increase of mRNA due to replication of the
254 parasite over time and differences in the isolation of mRNA among individual samples. The
255 relative expression of the tachyzoite-specific gene ENO2 did not change significantly from 1 to 6
256 days after infection of primary skeletal muscle cells as compared to the transcript level at 4 hours
257 (Fig. 2C). In contrast, the relative levels of *T. gondii* ENO1 transcripts continuously increased
258 from 4 hours after infection until the end of observation with the most prominent increases being
259 observed at 4 and 6 days following infection (Fig. 2C). These results clearly confirmed the view

260 of a high level of spontaneous conversion of *T. gondii* tachyzoites to bradyzoites in skeletal
261 muscle cells.

262 Tissue cysts of *T. gondii* are preferentially found in the central nervous system including the
263 retina and in striated muscles of infected animals (Dubey et al., 1998). Such tissue tropism may
264 partially result from reduced or inadequate anti-parasitic immune responses in these organs. Cyst
265 numbers in the brains of mice differ depending on the MHC genetic background (Brown and
266 McLeod, 1990), indeed confirming a role for immune-mediated mechanisms in the regulation of
267 tissue cyst development within the brain. However, here we have shown for the first time that
268 initial prerequisites of parasite persistence, i.e. invasion of suitable host cells by *T. gondii*
269 tachyzoites and their transition to bradyzoites readily occur in primary skeletal muscle cells.

270 Importantly, such stage conversion in skeletal muscle cells occurred independently of exogenous
271 stress factors and was clearly more efficient than in fibroblasts indicating that it is critically
272 influenced by cell type-specific factors. Recently, Radke et al. (2006) demonstrated a critical role
273 of the human cell division autoantigen-1 (CDA-1) in bradyzoite development in human
274 fibroblasts. In those cells, parasite differentiation depended on trisubstituted pyrrole-triggered de
275 novo host cell transcription of CDA-1, i.e. a drug-induced cellular environment that sustains
276 bradyzoite formation (Radke et al., 2006). It is thus tempting to speculate that spontaneous stage
277 conversion in skeletal muscle cells depends on a constitutive expression of CDA-1, or on one of
278 the other genes encoding growth regulators of mammalian cells, the expression of which
279 correlated with bradyzoite formation (Radke et al., 2006). Since myotubes as employed herein
280 are withdrawn from cell cycle progression (Sabourin and Rudnicki, 2000), negative regulators of
281 the host cell cycle as CDA-1 (Chai et al., 2001; Tu et al., 2007) are indeed possible candidates
282 which could provide an adequate signal for the commitment of *T. gondii* to bradyzoite
283 development in skeletal muscle cells. Whether and to what extent the specific immunological
284 environment of striated muscle (Wiendl et al., 2005) regulates long-term persistence of *T. gondii*
285 cysts in vivo awaits future clarification.

286 In conclusion, skeletal muscle cells provide a host niche that readily triggers bradyzoite
287 development without the need of exogenous stress stimuli. We hypothesize that this at least
288 partially explains the preferential persistence of *T. gondii* in muscle tissues in vivo. It may,
289 thereby, provide the molecular basis for one of the major routes of transmission of an important
290 zoonotic parasite to humans, i.e. ingestion of raw or undercooked tissue cyst-containing meat
291 products from infected livestock.

292

293

294 **Acknowledgements**

295 We are grateful to W. Bohne, Göttingen for helpful discussion. This work received financial
296 support from the Bundesministerium für Bildung und Forschung (TOXONET01, grant 01 KI
297 0766 to C.G.K. Lüder). The support of M.F. Ferreira-da-Silva by the Deutscher Akademischer
298 Austauschdienst (DAAD)/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior
299 (CAPES), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the
300 Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) and the Katholischer Akademischer Ausländerdienst
301 (KAAD) is gratefully acknowledged.

302

303

304 **References**

- 305 Barbosa, H.S., Pereira, M.C.S., Meirelles M.N.L., 2000. Protocolos de culturas primárias. In:
306 Araújo-Jorge, T., de Castro, S.L., Doença de Chagas (Eds.), *Manual para experimentação*
307 *animal*. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 297-313.
- 308 Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U., 1993. Coexistence of heterogeneous populations of
309 *Toxoplasma gondii* parasites within parasitophorous vacuoles of murine macrophages as
310 revealed by a bradyzoite-specific monoclonal antibody. *Parasitol. Res.* 79, 485-487.

- 311 Bohne, W., Heesemann, J., Gross, U., 1994. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is
312 necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in
313 triggering stage conversion. *Infect. Immun.* 62, 1761-1767.
- 314 Brown, C.R., McLeod, R., 1990. Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in
315 *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 145, 3438-3441.
- 316 Chai, Z., Sarcevic, B., Mawson, A., Toh, B.-H., 2001. SET-related cell division autoantigen-1
317 (CDA1) arrests cell growth. *J. Biol. Chem.* 276, 33665-33674.
- 318 Dobrowolski, J.M., Sibley, L.D., 1996. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by
319 the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* 84, 933-939.
- 320 Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A., 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites,
321 bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol.*
322 *Rev.* 11, 267-299.
- 323 Dzierszynski, F., Mortuaire, M., Dendouga, N., Popescu, O., Tomavo, S., 2001. Differential
324 expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during
325 stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Mol. Biol.* 309, 1017-1027.
- 326 Ferguson, D.J.P., Hutchinson, W.M., 1987. An ultrastructural study of the early development
327 and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol. Res.* 73, 723-
328 734.
- 329 Ferguson, D.J.P., 2004. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage
330 conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int. J.*
331 *Parasitol.* 34, 347-360.
- 332 Fox, B.A., Gigley, J. P., Bzik, D.J., 2004. *Toxoplasma gondii* lacks the enzyme required for de
333 novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int. J. Parasitol.*
334 34, 323-331.

- 335 Gross U., Bormuth H., Gaissmaier C., Dittrich C., Krenn V., Bohne W., Ferguson D.J., 1995.
336 Monoclonal rat antibodies directed against *Toxoplasma gondii* suitable for studying
337 tachyzoite-bradyzoite interconversion in vivo. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 542-548.
- 338 Guimarães, E.V., Carvalho, L., Barbosa, H.S., 2008. Primary culture of skeletal muscle cells as a
339 model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis. *J. Parasitol.* 94, 72-83.
- 340 Montoya, J.G., Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965-1976.
- 341 Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software toll (REST®) for
342 group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time
343 PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36.
- 344 Radke, J.R., Donald, R.G., Eibs, A., Jerome, M.E., Behnke, M.S., Liberator, P., White, M.W.,
345 2006. Changes in the expression of human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma*
346 *gondii* growth and development. *PLOS Pathog.* 2, e105.
- 347 Sabourin, L.A., Rudnicki, M.A., 2000. The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Genet.* 57,
348 16-25.
- 349 Soète, M., Fortier, B., Camus, D., Dubremetz, J.F., 1993. *Toxoplasma gondii*: Kinetics of
350 bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 76, 259-264.
- 351 Soète, M., Camus, D., Dubremetz, J.F., 1994. Experimental induction of bradyzoite-specific
352 antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii in vitro*. *Exp*
353 *Parasitol.* 78, 361-370.
- 354 Streilein, J.W., 1995. Unraveling immune privilege. *Science* 270, 1158-1159.
- 355 Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., Cossu, G., Buckingham, M., 1997. Redefining the genetic
356 hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell*
357 89, 127-138.
- 358 Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans.
359 *Int. J. Parasitol.* 30, 1217-1258.

360 Tomavo, S., Weiss, L.M., 2007. *Toxoplasma* gene regulation and bradyzoite development. In:
361 Ajioka, J.W., Soldati, D. (Eds.), *Toxoplasma*. Molecular and cellular biology. Horizon
362 Bioscience, Norfolk, pp. 285-301.

363 Tu, Y., Wu, W., Wu, T., Cao, Z., Wilkins, R., Toh, B.-H., Cooper, M.E., Chai, Z., 2007.
364 Antiproliferative autoantigen CDA1 transcriptionally up-regulates p21^{Waf/Cip1} by activating
365 p53 and MEK/ERK1/2 MAPK pathways. *J. Biol. Chem.* 282, 11722-11731.

366 Wiendl, H., Hohlfeld, R., Kieseier, B.C., 2005. Immunobiology of muscle: advances in
367 understanding an immunological microenvironment. *Trends Immunol.* 26, 373-380.

368

369

370 Legends to illustrations

371

372 **Fig. 1.** Characterization of murine primary skeletal muscle cells during myogenesis. Satellite
373 cells were isolated from thigh muscles of mouse embryos and were differentiated to mature
374 myotubes in vitro. (A) Phase contrast micrographs of multiplicative myoblasts at 2 days after
375 isolation (a) and multiple mature myotubes 4 days later (b; arrows). (B) Expression of Myf-5,
376 MyoD and β -actin transcripts during myogenesis in primary skeletal muscle cells from 2 to 10
377 days after isolation of the cells. Transcripts were reverse transcribed and cDNAs amplified by
378 PCR using specific primer pairs. Amplification of β -actin was used as an internal standard to
379 normalize the amounts of cDNAs among different samples, non-template controls were run in
380 parallel (nc). (C) Immunofluorescence staining of multinucleated skeletal muscle cells at 6 days
381 after isolation from mouse embryos. Cells were immunolabelled with anti-MyoD and Cy-3
382 conjugated secondary antibodies.

383

384 **Fig. 2.** Intracellular development and transition of *T. gondii* to bradyzoites in skeletal muscle
385 cells. Primary skeletal muscle cells from mouse embryos were differentiated in vitro for 4-5 days

386 and were then infected with *T. gondii* tachyzoites for 4 hours to 6 days as indicated. L929 murine
387 fibroblasts infected with *T. gondii* were used as control cells (B, open symbols). Parasites were
388 visualized by indirect double immunofluorescence staining with CC2 monoclonal antibody
389 recognizing bradyzoite-containing PVs (green fluorescence) and polyclonal anti-*Toxoplasma*
390 serum (red fluorescence). (A) Images of each labelling were simultaneously obtained by
391 confocal laser scanning microscopy and were superimposed (merge); micrographs are
392 representative for the parasite development as observed in three independent experiments. (B)
393 The percentages of CC2-reactive bradyzoite-containing PVs in primary skeletal muscle cells
394 (closed symbols) or fibroblasts (open symbols) were determined microscopically by counting at
395 least 100 parasitophorous vacuoles per sample. Bars represent means \pm S.E.M. from three
396 independent experiments; significant differences between stage conversion in both cell types
397 were identified by Student's *t*-test (** $P < 0.01$). (C) Alternatively, RNA was isolated from
398 skeletal muscle cells at different time points after infection or from uninfected controls, and
399 analysed by quantitative real-time RT-PCR using primers which specifically amplify tachyzoite-
400 specific ENO2, bradyzoite-specific ENO1, or constitutively expressed *Toxoplasma* tubulin. The
401 relative gene expression levels of ENO 1 and ENO2 were calculated as the fold change between
402 4 hours after infection and later time points with tubulin as an internal standard in order to
403 normalize the amount of cDNA present in each sample. Data are presented as log₂ ratios \pm
404 S.E.M. and derive from two independent experiments.

Figure 1

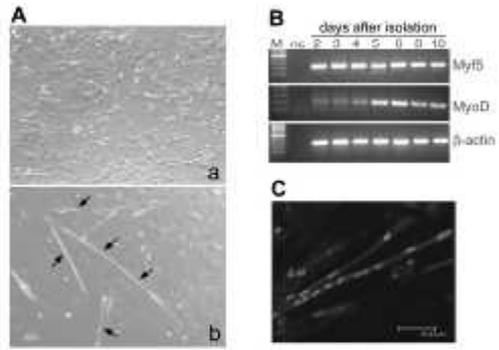
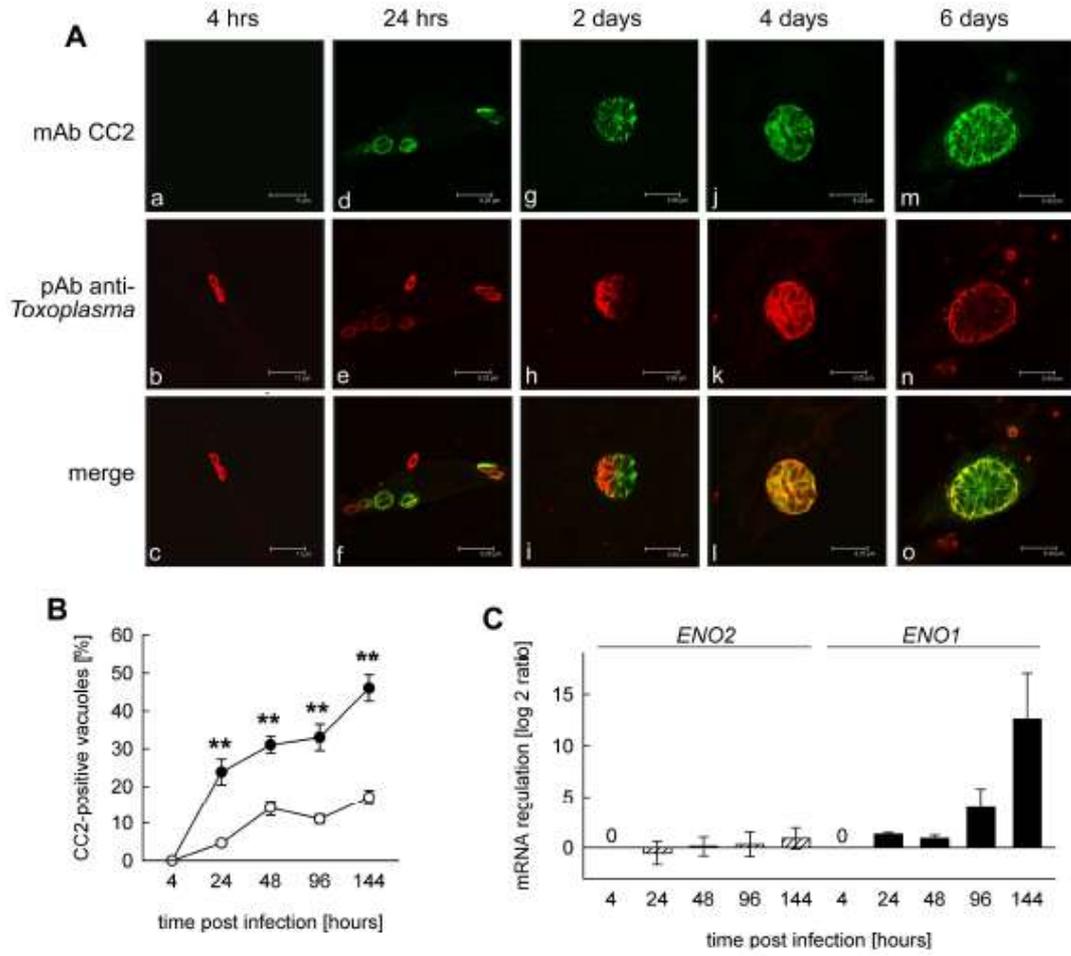


Figure 2



ANEXO II

1 **Q1** Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii* 1

5 Marialice da Fonseca Ferreira da Silva,^{ab} Helene S. Barbosa,^b Uwe Groß^a and Carsten G. K. Lüder^{ab} 5

Received 11th January 2008, Accepted 31st March 2008

First published as an Advance Article on the web

10 DOI: 10.1039/b800520f 10

Toxoplasma gondii is an obligatory intracellular parasitic protozoan that infects a variety of avian and mammalian hosts including up to one third of the human population worldwide. Developmental differentiation between distinct stages, *i.e.* sporozoites, tachyzoites and bradyzoites is fundamental for the parasite life cycle and for transmission between hosts. It is also interconnected with the pathogenesis of overt toxoplasmosis and makes *T. gondii* an important opportunistic pathogen of humans. In order to delineate the underlying mechanisms, several cell culture differentiation systems have been developed which mimic the transition from fast-replicating tachyzoites to slowly proliferating bradyzoites *in vitro*. Since exogenous stress factors, *i.e.* alkaline pH, IFN- γ and other proinflammatory cytokines, chemicals or drugs, heat shock, and deprivation of nutrients have been shown to increase the efficacy of bradyzoite development *in vitro*, *Toxoplasma* stage differentiation is largely viewed as a stress-related response to hostile environmental conditions. However, tachyzoite to bradyzoite differentiation also occurs spontaneously *in vitro* and this raises questions about the importance of stress conditions for triggering stage conversion. High frequencies of spontaneous bradyzoite development in primary and permanent skeletal muscle cells, *i.e.* cells that preferentially harbour bradyzoite-containing tissue cysts *in vivo* suggest that the host cell type may be critical. Furthermore, the host cell transcriptome, including the expression of distinct host cell genes, has recently been shown to trigger bradyzoite development and cyst formation. Together, these results strongly indicate that the complex cellular environment, besides exogenous stress factors, may govern the developmental differentiation of *T. gondii*. 30

Introduction 35

Developmental differentiation is a fundamental process in living organisms. It is essential in multicellular organisms and is common among prokaryotes and unicellular eukar-

yotes. Differentiation in single-celled organisms is a temporal phenomenon that is often associated with altered environmental conditions and involves the switching from one developmental stage to another. In the case of protozoan parasites, such differentiation is most frequently an obligatory process with distinct life cycle stages being required for sexual reproduction, for transmission between mammalian hosts and invertebrate vectors, or for survival within distinct niches of the host. ¹ Differentiation from one parasite stage to another is 40

^a Institute for Medical Microbiology, Georg-August-University, Kreyberggring 57, D-37075 Göttingen, Germany. E-mail: chuecker@gwdg.de; Fax: +49-551-395861; Tel: +49-551-395869

^b Laboratory of Structural Biology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil



Marialice da Fonseca Ferreira da Silva



Helene S. Barbosa



Uwe Groß



Carsten G. K. Lüder 45

Q2

1 also a critical factor in the pathogenesis of several protozoan diseases.

Toxoplasma gondii is an obligatory intracellular parasite of avian and mammalian hosts including humans. It is considered to be one of the most ubiquitously distributed and widespread parasites with a seroprevalence in humans of up to 30% worldwide.² Fortunately, infection of immunocompetent hosts is mostly asymptomatic or benign, however *T. gondii* is an important opportunistic pathogen of immunocompromised patients, *i.e.* those with AIDS, and the fetuses of recently infected pregnant women.³

The life cycle of *T. gondii* involves the developmental switching between three infectious stages: tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites. Infection by *Toxoplasma* is typically acquired by the ingestion of undercooked meat from infected hosts which chronically harbor bradyzoite-containing tissue cysts, or through the accidental ingestion of sporozoite-containing oocysts which are shed into the environment with the feces of cats (the definitive host).^{2,4} In addition, following primary maternal infection during pregnancy, *T. gondii* tachyzoites can be vertically transmitted to fetuses by transplacental migration.^{2,4} Differentiation from the tachyzoite to the bradyzoite stage of *Toxoplasma* is crucial for the development of tissue cysts and, thus for the persistence of the parasite for long time in the host.^{5,6} Consequently, it is a main prerequisite for parasite transmission² as well as the pathogenesis of reactivated toxoplasmosis.³

Considering the importance of cystogenesis of *T. gondii* in the parasite life cycle and the pathogenesis of disease, there has been an intense focus on the development of methods to study tachyzoite-bradyzoite differentiation. Although the occurrence of bradyzoite-containing tissue cysts *in vitro* was reported more than 45 years ago,⁷ the molecular basis for the developmental switch and the precise factors that promote this important event are only recently beginning to emerge.^{1,5,8,9} The development of *in vitro* systems to study the inter-conversion of tachyzoites and bradyzoites has opened doors to analyze the precise mechanisms that regulate developmental differentiation in *T. gondii*. Optimized culture conditions have been applied in order to maximize bradyzoite differentiation and to analyze this phenomenon at the molecular level and for extended periods of time *in vitro*.¹

This review will focus on the *Toxoplasma* tachyzoite-bradyzoite differentiation and promote a discussion on the impact of exogenous stress conditions in different cell types to induce stage conversion *in vitro*. We will also raise the question of whether spontaneous stage conversion in certain cell types, *e.g.* skeletal muscle cells or neurons might contribute to the development of *Toxoplasma* tissue cysts to a considerable extent, thereby promoting transmission of an important zoonotic parasite to humans *via* raw or undercooked meat from infected livestock and to other hosts.

55 Stage conversion of *T. Gondii* *in vitro* and *in vivo*

After ingestion by intermediate hosts, *e.g.* humans or livestock animals, bradyzoites or sporozoites rapidly differentiate into tachyzoites, *i.e.* fast multiplying parasites which disseminate within the host and lead to the acute phase of infection.^{2,4} In

immunocompetent hosts, the innate and ensuing adaptive cell-mediated immune responses are capable of controlling the tachyzoite stage. However, the parasite is not completely eliminated and tachyzoites partially differentiate into slowly replicating bradyzoites. Such stage conversion is accompanied by the reorganization of the parasitophorous vacuole into tissue cysts which may contain hundreds of individual parasites and persist for extended periods of time in distinctive tissues in immunocompetent hosts. They are particularly prevalent in neural and muscular tissue and characterize the chronic phase of infection. Since bradyzoites—during experimental toxoplasmosis in mice or other laboratory animals—are first recognized after the onset of an efficient anti-parasitic immunity, it has been proposed that the stress exerted by the host's immune response may trigger the transition from the tachyzoite to the bradyzoite stage.¹⁰ This view is supported by the fact that during latent infection, bradyzoites can reconvert to replicative tachyzoites in severely immunocompromised hosts, eventually giving rise to necrotizing lesions and life-threatening reactivated toxoplasmosis.³ This might indicate that anti-parasitic immunity at least stabilizes the latent form of the parasite in immunocompetent hosts. Whether it is also the main trigger for the transition of tachyzoites to bradyzoites, however, is not yet known. It is agreed that bradyzoite-containing tissue cysts are not static structures, instead they regularly break down and rupture host cells with a few parasites reinvading new host cells.^{11,12}

Studies *in vitro* have shown that immunological factors are not necessarily required for cyst formation. Several *in vitro* models have indeed been developed and may thus be suitable to study the molecular mechanisms of the interconversion of tachyzoites to bradyzoites in the absence of a complex host's response.^{13–24} Furthermore, *in vitro*-developed tissue cysts ultrastructurally resembled those which formed *in vivo* after the infection of mice.²⁵ However, *T. gondii* stage conversion is a heterogeneous process leading to mixed parasite populations comprised of both tachyzoites and bradyzoites.^{19,26} In order to increase the efficacy of parasite transition to the bradyzoite stage, the application of several stress conditions started 15 years ago when it was observed that parasites expressing bradyzoite proteins were more abundant in cell cultures grown under deleterious conditions. Based on that experience, the effect of different culture conditions on the differentiation of *T. gondii* has been investigated applying mainly five different stress factors: alkaline pH; IFN- γ and other pro-inflammatory cytokines or agents; high temperature; chemicals or drugs; and the depletion of nutrients. These have helped to define molecular prerequisites for *Toxoplasma* stage conversion and may open new avenues towards the development of novel approaches to ultimately defeat the infection.⁸

Stress conditions to induce bradyzoite development

Alkaline pH—the 'shift medium'

The induction of conversion from the tachyzoite to the bradyzoite stage by increasing the pH of the culture medium to pH 8.0–8.2 is the most common strategy to study *Toxoplasma* differentiation *in vitro* (Table 1).^{21,27,28} Bradyzoite

1 Table 1 Stress-induced bradyzoite formation and cyst development of *T. gondii*

Stress condition	Host cell	<i>Toxoplasma</i> strain	Induction of bradyzoites/ cysts	Ref.
5 Alkaline pH (pH 8.0–8.2)				
Continuous exposure of infected cells	Vero cells (African Green Monkey kidney cells), HFF (human foreskin fibroblasts), human fibroblast cell line	RH, ME49, VEG, 'exotic' strains COUG, CAST, GPHT	Bradyzoites, cyst-like vacuoles	9, 21, 27–29, 31, 33
Preexposure of parasite	HFF Human fibroblast cell line	'Exotic' strains MAS, FOU ME49	Weak induction Bradyzoites, cyst-like vacuoles	29 30
10 <i>IFN-γ</i>	Murine MΦ HFF Murine astrocytes	NTE RH, VEG, ME49 PE	Bradyzoites No induction No induction, but stabilization of cysts	20, 26 27, 28, 39 14
<i>Proinflammatory agents</i>	Rat neurons, astrocytes, microglia	NTE	No induction	38
15 IL-6	Human fibroblast cell line	ME49	Bradyzoites, cyst-like vacuoles	27
LPS	Murine MΦ	NTE	Bradyzoites	20
Sodium nitroprusside (NO)	Murine MΦ Rat CNS cells	NTE NTE	Bradyzoites Bradyzoites	20 38
	HFF, human fibroblast cell line	ME49, PLK	Bradyzoites	30, 40
20 <i>Therapeutics</i>				
atovaquone	Murine MΦ, Vero cells	NTE, PLK	Bradyzoites	41, 42
pyrimethamine	Murine MΦ	NTE	Bradyzoites	42
sulfadiazine	Murine MΦ Vero cells	NTE PLK	Bradyzoites No induction	42 41
Sodium arsenite	Vero cells, HFF	RH	Bradyzoites, no cyst-like vacuoles	28
25 <i>Mitochondrial inhibitors</i>				
oligomycin, antimycin	Murine MΦ	NTE	Bradyzoites	20
roxythiazol, rotenone	Vero cells	PLK	Bradyzoites	41
30 <i>Thiobutinated pyrrole (Compound 1)</i>	HFF	ME49, VEG	High levels of bradyzoites and cyst-like structures	39, 45
<i>Heat shock (43 °C)</i>	Vero cells	RH, GT-1 RH	Much weaker induction Bradyzoites, cyst-like vacuoles	39 28
<i>Deprivation of nutrients</i>				
Arginine starvation	HFF	RH, PLK/ME49	Bradyzoites, cyst-like vacuoles	54
35 Pyrimidine starvation	HFF	RHaupt, Prugnaud	Bradyzoites, cyst-like vacuoles	1, 55
Temporary axenic culture	HFF	PLK, 76K	Bradyzoites, cyst-like vacuoles	56
Cyclic nucleotide signaling	HFF	PLK, ME49	Bradyzoites	55, 56
40				40

45 differentiation appears to be more frequent and consistent under alkaline culture conditions than after treatment with pro-inflammatory cytokines.^{27,28} Moreover, parasites shifted towards the bradyzoite stage using alkaline pH represent the most defined bradyzoite phenotype that can be achieved in tissue culture.⁹ It has to be stressed, however, that alkaline pH does not represent a physiological stress condition that mimics the triggering of stage conversion *in vivo*.

50 The strategy that is mostly applied is to infect the host cells with *T. gondii* under physiological pH (pH 7.2–7.4) for several hours in order to allow host cell invasion by the parasite. After that time, the parasite-infected cell culture is maintained in an alkaline medium previously adjusted to pH 8.0–8.2 using KOH. *T. gondii*-infected cells in 'shift medium' are generally cultured in an atmosphere without exogenous CO₂ in order to avoid pH variation and to maintain the alkaline condition

45 over the experimental period.²⁸ Unfortunately, alkaline pH has often not permitted analysis of *Toxoplasma* bradyzoite development for extended periods of time because host cells are severely injured by the culture conditions. It has been nevertheless proven to be highly effective in inducing cyst development in the *Toxoplasma* mouse-virulent RH strain (Table 1).²⁸ Likewise, 3 to 4 days after infection of human 50 fibroblasts with the mouse-avirulent ME49 strain and maintenance at alkaline pH, development of thick-walled, electron lucent vacuoles became apparent, thus, resembling *Toxoplasma* tissue cysts (Table 1).²⁷ Such cyst-like vacuoles often contained odd numbers of parasites, indicating asynchronous parasite replication. Importantly, expression of the bradyzoite-specific protein BAG-1 was apparent using western blotting and further increased from day 3 to day 6.²⁷ The results were corroborated by immunofluorescence microscopy 55

1 demonstrating that the parasites expressed BAG-1 but not
SAG-1, thus, confirming that bradyzoite-specific but not
tachyzoite-specific antigens were expressed.²⁷ Bradyzoite forma-
2 tion and cyst development induced by alkaline pH was
5 recently extended to other *Toxoplasma* strains. Interestingly,
defects in the oral transmission of some 'exotic' parasite
strains correlated with an impaired capacity to differentiate
from tachyzoite to bradyzoites and to form cyst-like structures
(Table 1), thereby, highlighting the importance of stage con-
10 version for parasite transmission to new hosts.²⁹

Interestingly, bradyzoite development can also be induced
by exposure of extracellular tachyzoites to alkaline pH for
only one hour prior to infection of the host cells and cultiva-
tion at physiological pH (Table 1).³⁰ This avoids injury of the
15 host cells by the deleterious effect of high pH and may allow
the follow-up of stage conversion and cyst formation for
extended periods of time. Most importantly, it suggests that
commitment of *T. gondii* to differentiate to the bradyzoite
stage can occur rapidly and as a direct response of the parasite
20 to stressful conditions. It has to be mentioned, however, that
the rate of stage conversion after the short exposure of
extracellular parasites to alkaline pH was considerably lower³⁰
than that after continued cultivation of parasite-infected host
cells at high pH,²⁸ although a direct comparison of this issue
25 has not been undertaken. Therefore, a combination of both a
direct response of *T. gondii* to harmful conditions and an
indirect parasite response to host cell changes induced by
stress might trigger stage conversion.

T. gondii bradyzoites induced *in vitro* in human fibroblasts
30 using alkaline pH were also used to construct cDNA libraries
and to analyse this developmental stage genetically.^{9,31} Compar-
ison of expressed sequence tag (EST) frequencies or serial
analysis of gene expression (SAGE) tags from both tachyzoite-
and bradyzoite-derived libraries identified many stage-specifi-
35 cally expressed genes and was thereby indispensable in the
further characterization of the developmental differentiation
of *T. gondii*.^{9,31,32}

Recently, alkaline pH was used to identify autofluorescence
as a novel characteristic of *T. gondii* bradyzoites and cysts
40 after excitation with UV light of 330–385 nm.³³ This finding
could be useful for the rapid detection and quantification of
T. gondii cysts in complex samples or to increase our knowledge
on the structural features of tissue cysts.³³ Whether it also
applies to tissue cysts that have been generated *in vitro* by
45 other means than alkaline pH or that have developed *in vivo*
remains to be elucidated.

Interferon- γ and other proinflammatory cytokines—approaches 50 to mimic the immune system

In vivo, IFN- γ is absolutely required for resistance against *T.*
gondii.³⁴ In concert with other proinflammatory cytokines it
induces several effector mechanisms including the oxidative
burst, production of nitric oxide (NO) by the inducible nitric
55 oxide synthase (iNOS), tryptophan starvation, expression of
p47 GTPases and others which may limit parasite replication
or even kill *T. gondii*.³⁵ *In vitro* models of the tachyzoite-brady-
zoite differentiation that employ the anti-parasitic effect of
proinflammatory cytokines have the intention of partially

mimicking the stress for the parasite exerted by the host's
1 immune response.⁸ The role of IFN- γ in *in vitro* cultured cells
infected with *T. gondii* has been investigated for more than 20
years.^{14,26,36,37} IFN- γ has consistently been shown to limit
5 parasite replication *in vitro*^{20,26–28,36} whereas its impact on
stage conversion is less clear. Discrepancies in the effect on
triggering stage conversion may be largely related to the usage
of different cell types, parasite strains or host species. In IFN- γ
treated mouse macrophages, the expression of bradyzoite-
10 specific proteins was efficiently triggered (Table 1).^{20,26} How-
ever, in *T. gondii*-infected murine astrocytes or rat neural cells
cultured in the presence of IFN- γ , bradyzoite differentiation
and cyst formation was not enhanced (Table 1).^{14,38} Likewise,
IFN- γ was also inefficient in inducing stage conversion of the
15 virulent *Toxoplasma* RH strain or the avirulent VEG strain in
HFF cells (Table 1).^{23,39} Together, these studies imply that
IFN- γ is only effective in inducing stage conversion in certain
cell types and/or host species, but that it is required to limit
parasite replication, to prevent excessive host cell lysis and
20 thereby, to permit bradyzoite differentiation and cyst devel-
opment.^{14,27,28}

Analyses of the role of IFN- γ on bradyzoite differentiation
in *Toxoplasma*-infected murine macrophages identified nitric
oxide (NO) as a putative trigger.²⁰ Consequently, the NO
donor sodium nitroprusside (SNP) also induced bradyzoite
25 formation in murine macrophages, rat brain cells and human
fibroblasts (Table 1).^{20,30,33,40} However, since NO acts on
enzymes of the respiratory chain containing iron-sulfur centers,
this effect may be rather indirect, acting on the parasite
and possibly also the host cell mitochondrial electron trans-
30 port.^{20,41} It should be noted that finding NO as a trigger of
stage conversion might explain the differences in the induction
of bradyzoites by IFN- γ between host species and/or cell types
since the role of NO, for example in human cells, is contro-
35 versial.

IFN- γ was also correlated to the re-conversion of brady-
zoites to tachyzoites *in vitro*. Bradyzoite to tachyzoite differ-
entiation is particularly relevant during the pathogenesis of
overt and life-threatening toxoplasmosis in chronically in-
40 fected individuals upon immunosuppression, which often
leads to *Toxoplasma* encephalitis. This reactivation of latent
infection has not been extensively studied *in vitro*, but it is
generally assumed that abrogating the stress usually leads to a
rapid resumption of parasite multiplication, repression of
bradyzoite-specific genes and expression of tachyzoite-specific
45 ones.⁴² Jones *et al.* established long-term *in vitro* murine
astrocyte cultures which had been infected with brain-derived
Toxoplasma cysts.¹⁴ Treatment of these cultures with IFN- γ
starting from 40 days after infection (p.i.) limited parasite
replication but did not promote cyst development (see above).
50 Importantly, however, when IFN- γ was removed at 120 days
p.i. cyst rupture with many surrounding tachyzoites became
apparent within one week and after an additional two weeks
the astrocyte cultures were heavily infected with parasites of
different stages, but with a predominance of tachyzoites.¹⁴
55 These observations suggested that re-conversion of
Toxoplasma bradyzoites to tachyzoites could be prevented *in*
vitro when IFN- γ was present in the medium. It can be
hypothesized that IFN- γ stabilizes *Toxoplasma* cysts by

1 promoting the toxoplasmatatic activity of astrocytes, thereby
keeping mature bradyzoites in a G₀ arrested cell cycle stage.⁴³
Upon removal of IFN- γ by contrast, cell cycle re-entry and
recrudescence of an ongoing tachyzoite cell cycle may occur.⁴³
5 Beside IFN- γ , the effect of other proinflammatory cytokines
on *Toxoplasma* bradyzoite differentiation has been deter-
mined. Interleukin (IL)-6 which is produced by various lym-
phoid and non-lymphoid cell types during inflammatory
responses, and which induces an acute phase response, in-
10 creased the number of *Toxoplasma* cysts that formed *in vitro*
in human fibroblasts (Table 1).²⁷ Remarkably, no synergism of
IFN- γ and IL-6 in bradyzoite formation was recognized in
human fibroblasts, again supporting the view that IFN- γ is
ineffective in inducing stage conversion in these cells.²⁷ In
15 contrast, in murine macrophages lipopolysaccharide (LPS)-
induced tumor necrosis factor (TNF)- α secretion, together
with low concentrations of IFN- γ , synergistically induced
the transition of tachyzoites to bradyzoites (Table 1).²⁹ Max-
imal activation of the macrophages by high levels of both
20 IFN- γ and LPS again abrogated bradyzoite development,
since parasite replication was completely abolished.²⁹ It there-
fore appears that sub-maximal activation of murine macro-
phages is required to allow a low level of parasite replication,
or at least cell cycle progression to reach a premitotic cell cycle
25 checkpoint that permits entry into a modified bradyzoite
differentiation pathway.⁴³ In contrast, complete inhibition of
parasite replication may prevent the parasite reaching a phys-
iological state that is appropriate for starting stage conver-
sion.

30 Drugs and chemicals

Most of the studies that have analysed the activity of anti-
microbial agents on *Toxoplasma in vitro* are restricted to the
35 effect on parasite replication rather than on stage conversion.
Usage of different *Toxoplasma* strains, different host cell types
as well as different methods for determining the rate of multi-
plication and bradyzoite differentiation hamper direct com-
parisons. The chemotherapeutics that are most widely used are
40 pyrimethamine, sulfadiazine, clindamycin, spiramycin, hydro-
xynaphthoquinones and new macrolides.⁴² The combination
of pyrimethamine and sulfadiazine is routinely used for the
therapy of human toxoplasmosis and has been shown to be
most effective in the reduction of tachyzoite replication *in vivo*
45 and *in vitro*. At the same time, however, pyrimethamine and
partially sulfadiazine also induce the expression of bradyzoite-
specific antigens (Table 1).^{41,42} Likewise, the hydronaphtho-
quinone atovaquone, which appears to have both anti-tachy-
zoite and anti-bradyzoite activity⁴⁴ also significantly reduced
50 *Toxoplasma* replication but was even more effective in indu-
cing conversion towards the bradyzoite stage than pyrimetha-
mine and sulfadiazine (Table 1).^{41,42} Thus, chemotherapeutics
that decrease *Toxoplasma* replication and avoid overt clinical
disease in infected patients may at the same time promote
55 stage conversion and persistence of the parasite.

In addition to studying the impact of anti-*Toxoplasma* drugs
on stage conversion from a pharmacological point of view,
several chemical compounds have been used to increase the
efficacy of stage conversion *in vitro* and to analyse the under-

lying mechanisms. Sodium arsenite was shown to efficiently
1 induce the expression of bradyzoite-specific antigens, but did
not induce cyst formation (Table 1).²⁸ This is remarkable since
it uncouples at least the initial events of bradyzoite differentia-
tion and cyst development, thus indicating that the formation
5 of mature *Toxoplasma* cysts is under control of more than one
checkpoint. Similarly, inhibitors of mitochondrial function,
i.e. oligomycin, antimycin A, rotenone, myxothiazol or the
chemotherapeutic agent atovaquone induced the expression of
bradyzoite-specific proteins although it is unclear whether
10 these parasites would build mature cysts (Table 1).^{29,41} As
already indicated above, these findings link the *in vitro*-
induced differentiation of *Toxoplasma* towards bradyzoites with
mitochondrial function under certain conditions. Whether this
also applies to the process as observed *in vivo* remains un-
15 known.

Recently, a trisubstituted pyrrole termed compound 1 was
shown to efficiently limit parasite replication, to induce
bradyzoite differentiation and to lead to cyst development *in vitro*
20 in human fibroblasts (Table 1).^{39,45} Remarkably, bradyzoite
development was shown to critically depend on the induced
expression of the cell division autoantigen-1 by the host cells.³⁹
This indicated for the first time that the drug-induced altera-
tion of transcription of a distinct host cell gene directly trigger
25 *Toxoplasma* differentiation (see below).

High temperature—the heat shock treatment

Another strategy to induce *Toxoplasma* stage conversion is to
30 apply high temperatures. This involves a pre-treatment of the
host cells for 2 h at 43 °C to allow the acquisition of thermo-
tolerance.^{46,47} After returning to 37 °C, cells are infected with
Toxoplasma tachyzoites for 2 h and then again heat-shocked at
43 °C for 12–48 h. Afterwards, the infected cells are main-
35 tained at 37 °C until the end of the experiment. This approach
effectively induced the development of bradyzoites (Table 1).²⁸
Prolonged heat treatment of the parasite-infected cells for up
to 48 h resulted in the largest number of cyst-like structures,
which resembled mature cysts, purified from the brain of
40 chronically infected mice.²⁸ This shows that heat treatment
appears appropriate to mimic the complete differentiation
from tachyzoites to cysts *in vitro*. Whether fever during acute
toxoplasmosis *in vivo* also promotes stage conversion has not
yet been determined. Importantly, heat shock induces the
45 differentiation process in both mouse-avirulent and mouse-
virulent *Toxoplasma* strains, although differentiation is gen-
erally more efficient in avirulent parasites.

As in prokaryotes and other eukaryotes, heat shock and
several other stress conditions are also associated in *T. gondii*
50 with the induction of heat shock proteins (HSP).^{30,48–51} Since
many of these agents are also linked with the transition of
tachyzoites to bradyzoites *in vitro*, the role of HSPs during
stage conversion of *Toxoplasma* has been further determined.
Surprisingly, expression of the small HSP-related bradyzoite-
specific HSP30/BAG-1 was dispensable for stage conversion
55 and tissue cyst development *in vitro* and *in vivo*.⁵² In contrast,
inhibition of *T. gondii* HSP72 (proposed to be a member of the
HSP70 family³⁰) and HSP90 using quercetin and/or geldana-
mycin, considerably suppressed tachyzoite to bradyzoite

1 transition *in vitro* suggesting a role in bradyzoite differentia- 1
tion.^{30,51} It has to be stressed however, that expression of 2
HSP70 transiently also increased during bradyzoite to tachy- 3
zoite differentiation *in vitro*.⁵³ Similarly, pharmacological in- 4
hibition of HSP90 not only impaired tachyzoite to bradyzoite 5
development but also that from bradyzoites to tachyzoites.⁵¹ 6
These results indicate that the role of HSP70 and HSP90 is not 7
restricted to stress-induced bradyzoite development but that 8
they rather generally regulate maintenance of protein structure 9
and function during developmental differentiation of *T. gondii*. 10

Nutrient stress—putting *Toxoplasma* on a diet

11 It is obvious that the rapidly proliferating tachyzoite form of 12
13 *Toxoplasma* has a higher need for nutrients than the slow-
replicating dormant bradyzoite stage. Recently, it has indeed
been shown that deprivation of the amino acid arginine
efficiently blocks parasite replication and triggers the differ-
entiation of tachyzoites into bradyzoites as well as the devel-
opment of cyst-like structures *in vitro* (Table 1).⁵⁴ *T. gondii*
lacks the enzymes required for *de novo* arginine biosynthesis
and thus relies on arginine uptake from the host cell.⁵⁴ Con-
sequently, formation of bradyzoite-containing cyst-like
structures by arginine starvation was highly efficient in both
mouse-virulent and mouse-avirulent *Toxoplasma* strains,
whereas the viability of parasites was not affected. The star-
ving of *T. gondii* in a related metabolic pathway, *i.e.* the
pyrimidine *de novo* biosynthesis and salvage pathway also
induces expression of bradyzoite-specific genes (Table 1). This
was convincingly demonstrated by culturing mouse-virulent
RH parasites that lack the uracil phosphoribosyltransferase
(*Uppt*) at ambient CO₂ concentration (0.03%).⁵⁵ *T. gondii* has
a fragmented pyrimidine salvage pathway that critically relies
on the *uppt* gene whereas CO₂ is required for *de novo* synthesis
of the pyrimidine ring. Simultaneous inhibition of the *de novo*
biosynthesis pathway and the salvage pathway, therefore,
efficiently abrogated uracil monophosphate (UMP) synthesis,
i.e. the precursor of all pyrimidines used by the parasite and
led to reduced parasite growth and transition towards the
bradyzoite stage.⁵⁵ Furthermore, even in wildtype parasites,
i.e. in the presence of the *uppt* gene, CO₂ starvation led to
bradyzoite differentiation and cyst-like vacuoles.¹ Inhibition
of the pyrimidine *de novo* biosynthesis pathway may be
sufficient to lower the available UMP pool to those levels that
trigger bradyzoite differentiation. It has to be stressed that the
levels of stage conversion induced by ambient CO₂ in wildtype
parasites clearly differ between strains with much higher levels
being observed in the mouse-avirulent Prugnaud strain¹ than
in the mouse-virulent RH strain.⁵⁵ Together, these studies
indicate that limited availability of distinct nutrients regulate
stage differentiation and is a valuable novel approach to
increase bradyzoite formation *in vitro* and to further our
knowledge on stage conversion of *Toxoplasma*.

14 As an obligatory intracellular parasite, temporary axenic 15
cultivation may—among other factors—also deprive *T. gondii*
tachyzoites of essential nutrients and growth factors. Twelve
hours in the absence of host cells indeed induced the expres-
sion of bradyzoite-specific genes and the formation of cyst-like
vacuoles after subsequent infection of HFF cells (Table 1).⁵⁶

16 Importantly, this finding again demonstrates that stress condi- 1
tions directly exerted on the parasite can trigger stage 2
conversion of *T. gondii* if the parasite is subsequently placed 3
into a suitable cellular environment. 4

Cyclic nucleotides—regulators of stress-related bradyzoite 5 formation?

6 In a variety of organisms, stress and differentiation responses 7
are associated with conserved cyclic nucleotide signalling 8
pathways. Similarly, permanently or transiently increasing 9
the levels of intracellular cGMP and cAMP, respectively, has 10
been shown to induce bradyzoite differentiation in *T. gondii*
(Table 1).⁵⁷ In addition, inhibitors of downstream cAMP- and 11
cGMP-dependent protein kinases led to tachyzoite-bradyzoite 12
transition (Table 1).⁵⁸ It is worthy to note that the NO donor 13
SNP, *i.e.* one of the stress-related triggers of stage conversion 14
(see above) also transiently increased intracellular cAMP 15
levels in both host cells and parasites.⁵⁷ Furthermore, eleva- 16
tion of the parasite cAMP level was critically associated with 17
the ability of *T. gondii* to differentiate to the bradyzoite stage 18
since it was only observed in the cyst-forming PLK strain but 19
not in the RH strain which has often a diminished capacity to 20
form bradyzoites.⁵⁷ These findings raise the interesting possi- 21
bility that cAMP and cGMP signalling are potentially 22
critical regulators of the stress-related differentiation process 23
in *T. gondii*. 24

Spontaneous stage conversion of *T. Gondii*

25 Analyses of *Toxoplasma* stage conversion under stress condi- 26
tions have doubtless broadened our understanding of a critical 27
event of the parasite life cycle and on the pathogenesis of 28
disease. The finding of various stress factors inducing stage 29
conversion and cyst development has put forward the view 30
that bradyzoite differentiation is a stress-related response of *T.* 31
gondii to hostile environmental conditions, such as the inflam- 32
matory response to the tachyzoite stage. Bradyzoite develop- 33
ment may indeed share features common to other stress- 34
induced differentiation processes such as the deprivation of 35
nutrients and endospore formation in bacilli, glucose starva- 36
tion and hyphae formation in fungi, or spore formation in 37
Dictyostelium discoideum.⁵ Being an obligatory intracellular 38
parasite that relies on persistence within its host, it appears 39
likely, however, that stage differentiation in *Toxoplasma* is 40
partially or predominantly regulated by other factors than 41
those observed in commensals or free-living organisms. Long- 42
standing observations as well as recent developments support 43
the view that bradyzoite formation might be physiologically 44
regulated by other factors than stress. 45

Spontaneous bradyzoite development

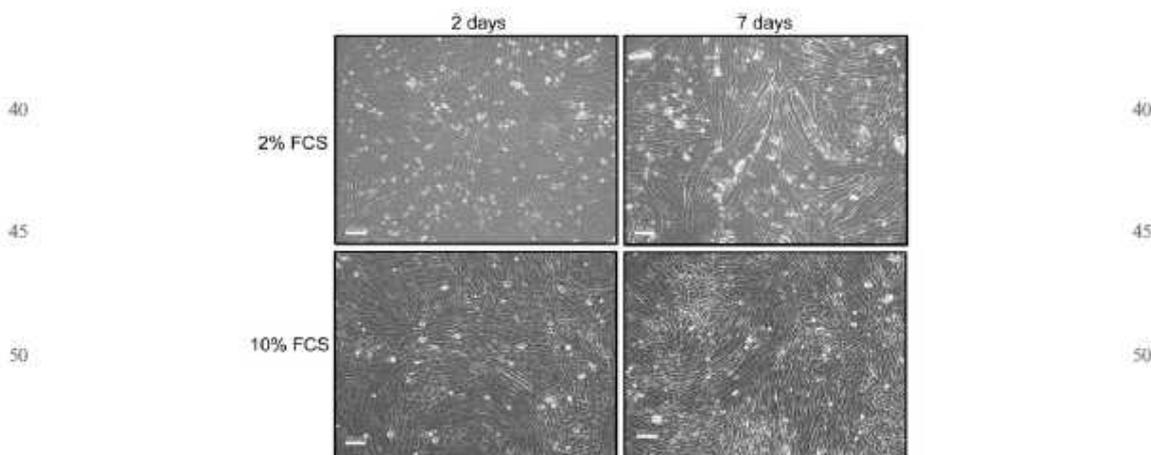
46 Bradyzoites and cyst-like structures can develop in cell cul- 47
tures in the absence of exogenous immune regulators, *i.e.* 48
proinflammatory cytokines.^{14,20,34,26,33} In addition, tachyzoite 49
to bradyzoite transition can occur spontaneously without 50
applying any stress factor, although mostly at a lower fre- 51
quency when compared to stress-induced condi- 52
tions.^{13–18,21,22,27,23,39,59–61} After inoculation of tachyzoites 53
directly into the brains of mice, conversion to the bradyzoite 54
55

1 stage was evident within 2–3 days, *i.e.* earlier than required for
a robust anti-parasitic immune response.⁶² This suggested that
spontaneous differentiation of tachyzoites to bradyzoites
might have also occurred *in vivo*. The low frequency of
5 bradyzoite formation that is normally observed in the absence
of exogenous stress factors *in vitro* may indeed suffice *in vivo* to
guarantee the formation of enough tissue cysts and thereby
parasite persistence and transmission to new hosts.

The rate of spontaneous tachyzoite to bradyzoite differ-
entiation varies among *Toxoplasma* strains^{9,20,63} with the mouse-
avirulent type II or III strains generally switching at higher
rates than the mouse-virulent type I strains. Furthermore, the
infective stage of *Toxoplasma* may also be critical since high
frequency of tachyzoite to bradyzoite development was ob-
served after inoculation of sporozoites and several subsequent
15 rounds of rapid tachyzoite proliferation.⁶¹ Interestingly, bra-
dyzoite formation was preceded by, and critically depended
on, a parasite cell cycle shift towards slower growth.^{43,61}
Reduced parasite replication is thus not only linked to
stress-induced bradyzoite development (see above) but is also
crucial during spontaneous stage conversion. The importance
of a reduced parasite replication for spontaneous stage con-
version has recently been extended to the tachyzoite-brady-
zoite transition following the initial inoculation of mature
25 bradyzoite-containing cysts.⁴³ Consequently, a change in the
premitotic period of the cell cycle with the occurrence of a
novel G₂-like phase that is not present in rapidly dividing
tachyzoites has been associated with bradyzoite differentiation
of *Toxoplasma*.⁴³ It will be interesting to see whether the
occurrence of this novel G₂-like cell cycle phase represents a
30 default pathway after several rounds of tachyzoite replication
or rather it is a switch in the cell cycle progression that is
governed by environmental conditions that are sensed at a
distinct cell cycle checkpoint.

Impact of the host cell on bradyzoite development and cyst formation

Whether the host cell type is a determinant for *Toxoplasma*
tachyzoite–bradyzoite conversion is a matter of controversy.
Most cell lines indeed support at least some degree of tissue
cyst formation and this has led to the conclusion that the cell
type does not contribute greatly to bradyzoite formation.^{4,16,63}
It should be stressed, however, that this issue has never been
quantitatively compared. Furthermore, analyses of tachyzoite
yields *in vitro* indicated profound differences depending on the
cell type.⁶⁴ Practical considerations, *e.g.* availability, ease of
handling and maintenance, and robustness (the latter particu-
larly during stress-induced bradyzoite formation) have put
forward the use of human fibroblasts as a common host cell
type to study stage differentiation (for a list of cell types used
for the analyses of bradyzoite differentiation see ref. 4 and 63).
15 *In vivo*, however, it is well known that bradyzoite-containing
cysts of *Toxoplasma* are predominantly found in brain and
muscle tissues⁴ and within the brain, neurons appear to be the
major cell type for parasite persistence.⁶⁵ These findings have
raised doubts whether bradyzoite differentiation indeed occurs
independently of the host cell type. Certainly, depending on
the host species, cyst formation also occurs in visceral organs
including liver and kidney.⁴ The predominant localization of
tissue cysts in brain and muscles could, therefore, just reflect
the longevity of neurons and muscle cells or the immunologi-
cal environments in these tissues that would ensure the long
term persistence of the latent infection. Conversely, it can also
be hypothesized that neurons and muscle cells (or the respec-
tive tissues) provide an appropriate cellular environment that
readily sustains tissue cyst development. This view is sup-
ported by studies on *Toxoplasma* differentiation and develop-
ment that were carried out in primary rat CNS cells. The
results showed that bradyzoites developed spontaneously

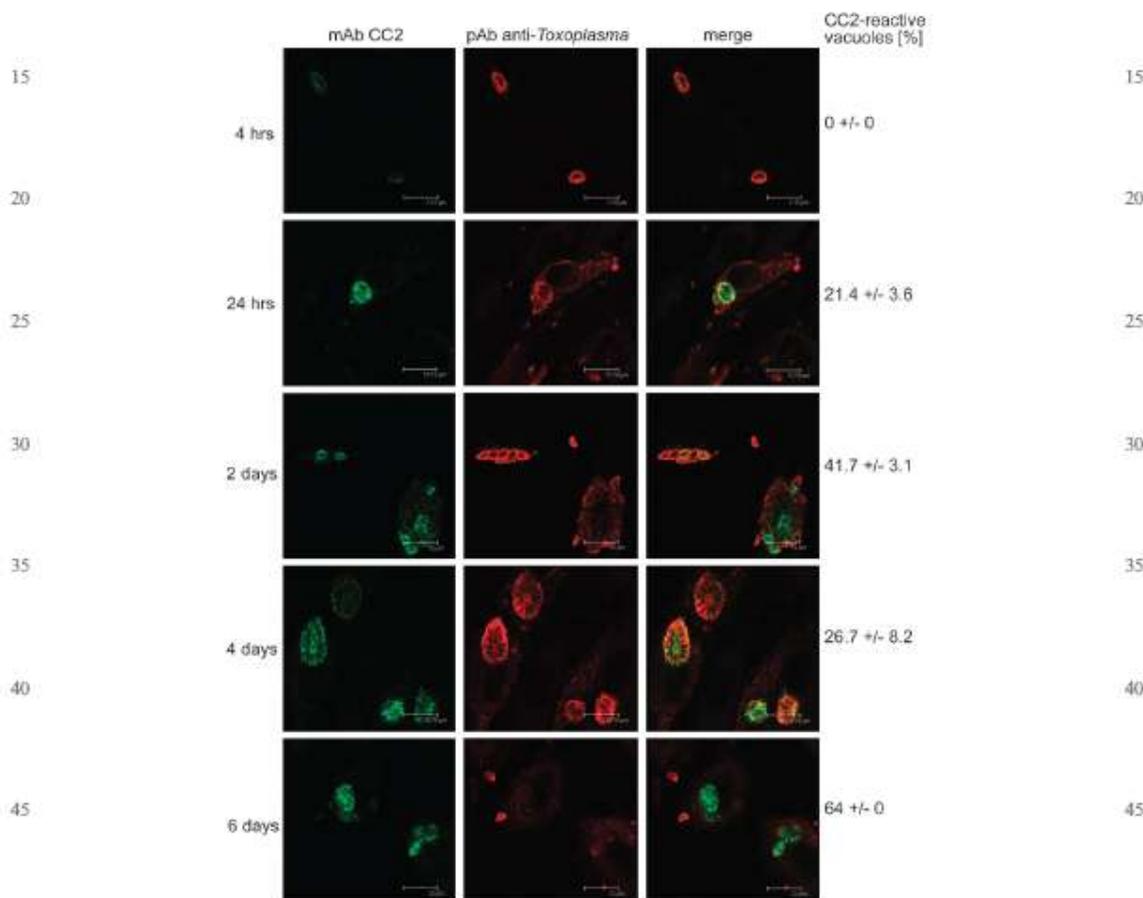


55 **Fig. 1** Differentiation of L6.C10 rat skeletal myoblast cells *in vitro* for subsequent infection with *T. gondii*. L6.C10 cells were cultivated in DMEM medium containing 10% fetal calf serum (FCS). Two days after seeding and formation of a nearly confluent monolayer, the cells were differentiated to myotubes by cultivation in medium with low serum content (2% FCS). Differentiation to mature skeletal muscle cells was judged by the occurrence of multiple syncytial myotubes at 7 days after seeding. In contrast, continued cultivation of L6.C10 control cells in medium with high serum content (10% FCS) predominantly sustained cell proliferation. Scale bar represents 100 μ m.

1 within neurons, astrocytes and microglia indicating that these
cell types may serve as appropriate host cells for the initial
steps of tissue cyst development.³⁸ Furthermore, Jones *et al.*
5 reported on a cell culture system which supported the develop-
ment and long-term maintenance of *T. gondii* tissue cysts in
primary murine astrocytes over a period of 120 days¹⁴ which
may be dependent on the specific host cell type.

We have recently started to investigate bradyzoite forma-
tion in skeletal muscle cells. Although *Toxoplasma* cysts have a
10 predilection for muscle tissues,^{4,66} little attention has been

1 given to muscle cells as a host cell type to study
Toxoplasma-host cell interaction or stage differentiation. This
is particularly surprising, since persistence of *Toxoplasma* cysts
in skeletal muscle tissue is of major relevance for the parasite
5 transmission to humans *via* raw or undercooked meat. Using
primary skeletal muscle cells that had been differentiated *in*
vitro to mature myotubes, we found a remarkably high
frequency of spontaneous tachyzoite to bradyzoite differentia-
tion until six days after tachyzoite infection (Ferreira-da-Silva
10 and Lüder, unpublished). As an alternative option to study the



50 Fig. 2 Tachyzoite-to-bradyzoite differentiation of *T. gondii* in L6.C10 rat skeletal muscle cells in the absence of exogenous stress factors. L6.C10
myoblasts were allowed to differentiate to myotubes in medium with 2% serum for 5 days as shown in Fig. 1. Thereafter, cells were infected with
tachyzoites of the *T. gondii* NTE strain and were fixed at 4 h, 24 h, 48 h, 4 days and 6 days after infection. Parasites were immunostained with mAb
CC2 which specifically recognizes bradyzoite-containing vacuoles (green fluorescence) along with a *Toxoplasma*-specific antiserum which
recognizes all parasites (red fluorescence) by indirect double immunofluorescence staining. Representative images of each labelling were obtained
55 by confocal laser scanning microscopy and were superimposed (merge). At 4 h post infection, tachyzoites of *T. gondii* did not bind the CC2
antibody, but reacted with the polyclonal anti-*Toxoplasma* serum. Increasing reactivity of parasites with mAb CC2 indicated differentiation
towards the bradyzoite stage during the time course. Note that 6 days after infection, the reactivity of CC2-positive parasites (green) with the
Toxoplasma-specific serum (red) had considerably diminished suggesting decreased expression of immunodominant tachyzoite-specific antigens
(e.g. SAC-1) which are predominantly recognized by the polyclonal *Toxoplasma* antiserum. Data represent percentages (mean \pm S.E.M.) of CC2-
reactive vacuoles.

1 interconversion of *Toxoplasma* in muscle cells *in vitro* we also
 employed the rat myoblast cell line L6C10. The cells were
 maintained subconfluent (in order to prevent spontaneous
 differentiation) in Dulbecco's ME medium supplemented with
 5 10% FCS and antibiotics and were regularly trypsinized and
 seeded at 1000–3000 cells cm⁻². In order to support the
 differentiation of myoblasts after they had just reached con-
 fluence, they were cultivated in DMEM with reduced serum
 content, i.e. 2% FCS and myotube formation was confirmed
 10 by phase contrast microscopy (Fig. 1). Importantly, after
 inoculation of such muscle cell cultures with *T. gondii*, sponta-
 neous differentiation of tachyzoites to bradyzoites was readily
 observed as determined by differential immunofluorescence
 microscopy. Bradyzoites developed at high frequencies during
 15 the first two days of infection (Fig. 2) thus confirming results
 from primary murine muscle cells. Although bradyzoite-con-
 taining vacuoles were also clearly detectable at later time
 points (Fig. 2), it has to be mentioned, however, that we were
 unable to reproducibly observe high frequencies of bradyzoite-
 20 containing vacuoles during sustained cultivation periods due
 to the degeneration of the cell culture monolayers. Never-
 theless, high frequencies of tachyzoite–bradyzoite switching in
 both primary and continuous skeletal muscle cells support the
 hypothesis that the cellular environment including the type of
 25 host cell may regulate *Toxoplasma* differentiation.

Besides the host cell type, the physiology of the host cell has
 recently been shown to have a major impact on bradyzoite
 differentiation. Changes in gene transcription after treatment
 of human fibroblasts with a trisubstituted pyrrole were accom-
 30 panied by reduced parasite replication and high frequencies of
 bradyzoite differentiation.³⁹ In fact, up-regulation of the hu-
 man cell division autoantigen (CDA)-1 was shown to trigger
 bradyzoite development and cyst formation as revealed by
 siRNA knockdown. Furthermore, overexpression of CDA-1
 35 sufficed to inhibit parasite growth and to induce expression of
 bradyzoite-specific antigens.³⁹ This study elegantly showed
 that the host cell transcriptome can directly influence
Toxoplasma stage differentiation. It will be interesting to see
 whether CDA-1 is also a major trigger for the commitment of
 40 *Toxoplasma* towards the bradyzoite stage during spontaneous
 stage conversion in certain cell types, e.g. neurons or muscle
 cells.

Conclusions

45 Our knowledge on the intriguing process of stage differentia-
 tion in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii* has in-
 creased considerably by using the approach of stress-induced
 bradyzoite formation *in vitro*. Whether cellular stress exerted
 by the host during infection is the major regulator of cyst
 50 formation *in vivo*, however, remains unknown. Recent ad-
 vances in the cellular and molecular biology of stage conver-
 sion of *Toxoplasma* point towards the type and the physiology
 of the host cells as critical determinants. This also puts
 forward the view that spontaneous bradyzoite development
 55 in an appropriate cellular environment may be more impor-
 tant as previously thought. Certainly, we are still far from a
 complete picture of the regulation of stage conversion of *T.*
gondii but we are, nevertheless, on a good way to understand
 the molecular basis for bradyzoite differentiation and parasite

1 persistence. In further analyses, muscle cells may be a valuable
in vitro model which will allow us—beside neurons—to in-
 5 vestigate *Toxoplasma* stage conversion under conditions that
 more closely resembles the physiological environment in the
 infected host.

Acknowledgements

We are grateful to the Bundesministerium für Bildung und
 Forschung for financial support of the authors' work related
 10 to this article (TOXONET01, grant 01 KI 0766 to C. G. K.
 Lüder). The support of M. F. Ferreira-da-Silva by the
 Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD)/Coorde-
 nação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior
 (CAPES), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Cien-
 15 tífico e Tecnológico (CNPq), the Instituto Oswaldo Cruz
 (FIOCRUZ) and the Katholischer Akademischer Austausch-
 dienst (KAAD) is highly appreciated.

References

- 1 F. Dzierżynski, M. Nishi, L. Outko and D. S. Roos, Dynamics of
Toxoplasma gondii differentiation, *Eukaryot. Cell*, 2004, 3,
 992–1003.
- 2 A. M. Tenter, A. R. Heckeroth and L. M. Weiss, *Toxoplasma*
gondii: from animals to humans, *Int. J. Parasitol.*, 2000, 30,
 1217–1228.
- 3 J. G. Montoya and O. Liesenfeld, Toxoplasmosis, *Lancet*, 2004,
 363, 1965–1976.
- 4 J. P. Dubey, D. S. Lindsay and C. A. Speer, Structures of
Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and
 biology and development of tissue cysts, *Clin. Microbiol. Rev.*,
 1998, 11, 267–299.
- 5 L. M. Weiss and K. Kim, The development and biology of
 bradyzoites of *Toxoplasma gondii*, *Front. Biosci.*, 2000, 5,
 D391–405.
- 6 J. K. Frankel, Letter: Cytomegalovirus infection and *Toxoplasma*,
Am. J. Dis. Child., 1973, 126, 860–861.
- 7 M. J. Hogan, C. Yoneda, L. Fenney, P. Zweigart and A. Lewis,
 Morphology and culture of *Toxoplasma*, *Arch. Ophthalmol.*, 1960,
 64, 655–667.
- 8 W. Bolme, M. Holpert and U. Gross, Stage differentiation of the
 protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, *Immunobiology*, 1999, 201,
 248–254.
- 9 J. R. Radke, M. S. Bahinka, A. J. Mackey, J. B. Radke, D. S. Roos
 and M. W. White, The transcriptome of *Toxoplasma gondii*, *BMC*
Biol., 2005, 3, 26–43.
- 10 U. Gross, W. Bolme, M. Soets and J. F. Dubremetz, Develop-
 mental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of
Toxoplasma gondii, *Parasitol. Today*, 1996, 12, 30–33.
- 11 J. P. Dubey, C. A. Speer, S. K. Shen, O. C. Kwok and J. A. Blair,
 Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity,
 45 and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts, *J.*
Parasitol., 1997, 83, 870–882.
- 12 J. P. Dubey, Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*, *Int. J.*
Parasitol., 1998, 28, 1019–1024.
- 13 R. L. Hoff, J. P. Dubey, A. M. Bahbehani and J. K. Frankel,
Toxoplasma gondii cysts in cell culture: new biologic evidence, *J.*
Parasitol., 1977, 63, 1121–1124.
- 14 T. C. Jones, K. A. Benz and P. Erb, *In vitro* cultivation of
Toxoplasma gondii cysts in astrocytes in the presence of gamma
 interferon, *Infect. Immun.*, 1986, 51, 147–156.
- 15 M. L. Darda, B. Bouteille, M. J. Laboulet, A. Loubet and M.
 Pastré-Alexandra, *Toxoplasma gondii* ultrastructural study of
 cystic formations observed in human fibroblast culture, *Ann.*
 55 *Parasitol. Hum. Comp.*, 1989, 64, 403–411.
- 16 D. S. Lindsay, J. P. Dubey, B. L. Bingham and M. Toivio-
 Kinnunen, Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma*
gondii in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporo-
 zoites, *J. Parasitol.*, 1991, 77, 126–132.

- 17 T. D. McHugh, A. Gbewonyo, J. D. Johnson, R. E. Holliman and P. D. Butcher, Development of an *in vitro* model of *Toxoplasma gondii* cyst formation, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1993, 114, 325–332.
- 18 D. S. Lindsay, M. A. Toivio-Kinnunen and B. L. Blagburn, Ultrastructural determination of cystogenesis by various *Toxoplasma gondii* isolates in cell culture, *J. Parasitol.*, 1993, 79, 289–292.
- 19 M. Soete, B. Fortier, D. Camus and J. F. Dubremetz, *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*, *Exp. Parasitol.*, 1993, 76, 259–264.
- 20 W. Bohne, J. Heesemann and U. Gross, Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion, *Infect. Immun.*, 1994, 62, 1761–1767.
- 21 M. Soete and J. F. Dubremetz, *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion *in vitro*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1996, 219, 76–80.
- 22 A. Lane, M. Soete, J. F. Dubremetz and J. E. Smith, *Toxoplasma gondii*: appearance of specific markers during the development of tissue cysts *in vitro*, *Parasitol. Res.*, 1996, 82, 340–346.
- 23 J. Ricard, H. Pelloux, U. Gross, A. Meunier and P. Ambroise-Thomas, Induction of *Toxoplasma gondii* cystogenesis and multiplication arrest by treatments with a phosphatidylcholine-specific phospholipase C inhibitor, *J. Parasitol.*, 1999, 85, 583–585.
- 24 E. V. Guimarães, L. de Carvalho and H. S. Barbosa, Primary culture of skeletal muscle cells as a model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis, *J. Parasitol.*, 2008, 94, in press.
- 25 M. Salm, H. G. Fischer, U. Gross, I. Reiter-Owana and H. M. Seitz, Cyst formation by *Toxoplasma gondii* *in vivo* and in brain-derived culture: a comparative morphology and immunocytochemistry study, *Parasitol. Res.*, 1997, 83, 659–665.
- 26 W. Bohne, J. Heesemann and U. Gross, Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages, *Infect. Immun.*, 1993, 61, 1141–1145.
- 27 L. M. Weiss, D. Laplace, P. M. Takvorian, H. B. Tanowitz, A. Cali and M. Wittner, A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites, *J. Euk. Microbiol.*, 1995, 42, 150–157.
- 28 M. Soete, D. Camus and J. F. Dubremetz, Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* *in vitro*, *Exp. Parasitol.*, 1994, 78, 361–370.
- 29 B. Fux, J. Nawas, A. Khan, D. B. Gill, C. Su and L. D. Sibley, *Toxoplasma gondii* strains defective in oral transmission are also defective in developmental stage differentiation, *Infect. Immun.*, 2007, 75, 2580–2590.
- 30 L. M. Weiss, Y. F. Ma, P. M. Takvorian, H. B. Tanowitz and M. Wittner, Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response, *Infect. Immun.*, 1998, 66, 3295–3302.
- 31 I. D. Manger, A. Hehl, S. Parmley, L. D. Sibley, M. Marra, L. Hilker, R. Waterston and J. C. Boothroyd, Expressed sequence tag analysis of the bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*: identification of developmentally regulated genes, *Infect. Immun.*, 1998, 66, 1632–1637.
- 32 M. D. Ckery, U. Singh, I. J. Blader, J. L. Brewer and J. C. Boothroyd, *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression, *Eukaryot. Cell*, 2002, 1, 329–340.
- 33 Y. Lei, M. Davey and J. Ellis, Autofluorescence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* cysts *in vitro*, *J. Parasitol.*, 2005, 91, 17–23.
- 34 Y. Suzuki, M. A. Orellana, R. D. Schreiber and J. S. Remington, Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*, *Science*, 1988, 240, 516–518.
- 35 C. Lang, U. Groß and C. G. K. Lüder, Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*, *Parasitol. Res.*, 2007, 100, 191–203.
- 36 C. F. Nathan, H. W. Murray, M. E. Wiebe and B. Y. Rubin, Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity, *J. Exp. Med.*, 1983, 158, 670–689.
- 37 E. R. Pfefferkorn, M. Eckel and S. Rebhun, Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1986, 20, 215–224.
- 38 C. G. K. Lüder, M. Giraldo-Velasquez, M. Sendtner and U. Gross, *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation, *Exp. Parasitol.*, 1999, 93, 23–32.
- 39 J. R. Radke, R. G. Donald, A. Eibs, M. E. Jerome, M. S. Behnke, P. Liberator and W. W. White, Changes in the expression of the human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma gondii* growth and development, *PLoS Pathogens*, 2006, 2, e105.
- 40 L. A. Kirkman, L. M. Weiss and K. Kim, Cyclic nucleotide signaling in *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation, *Infect. Immun.*, 2001, 69, 148–153.
- 41 S. Tomavo and J. C. Boothroyd, Interconnection between organelle functions, development and drug resistance in the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*, *Int. J. Parasitol.*, 1995, 25, 1293–1299.
- 42 U. Gross and F. Pohl, Influence of antimicrobial agents on replication and stage conversion of *Toxoplasma gondii*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1996, 219, 235–245.
- 43 J. R. Radke, M. N. Gierini, M. Jerome and M. W. White, A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2003, 131, 119–127.
- 44 D. J. P. Ferguson, J. Huskinson-Mark, F. G. Araujo and J. S. Remington, An ultrastructural study of the effect of treatment with atovaquone in brains of mice chronically infected with the ME49 strain of *Toxoplasma gondii*, *Int. J. Exp. Path.*, 1994, 75, 111–116.
- 45 R. G. Donald, J. Allocco, S. B. Singh, B. Nare, S. P. Salowe, J. Witsie and P. A. Liberator, *Toxoplasma gondii* cyclic GMP-dependent kinase: chemotherapeutic targeting of an essential parasite protein kinase, *Eukaryot. Cell*, 2002, 1, 317–328.
- 46 O. S. Selawry, M. N. Goldstein and T. McCormick, Hyperthermia in tissue-cultured cells of malignant origin, *Cancer Res.*, 1957, 17, 785–791.
- 47 K. Henke and L. Dethlefsen, Heat fractionation and thermotolerance: a review, *Cancer Res.*, 1978, 38, 1843–1851.
- 48 R. Morimoto, A. Tissieres and C. Georgopoulos, *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, Harbor, NY, 1994.
- 49 W. Bohne, U. Gross, D. J. Ferguson and J. Heesemann, Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants, *Mol. Microbiol.*, 1995, 16, 1221–1230.
- 50 C. A. Dobbin, N. C. Smith and A. M. Johnson, Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine *Toxoplasma* infection via immunomodulation of host NF- κ B and nitric oxide, *J. Immunol.*, 2002, 169, 958–965.
- 51 P. C. Echeverria, M. Matrajt, O. S. Harb, M. P. Zappia, M. A. Costa, D. S. Roos, J. F. Dubremetz and S. O. Angel, *Toxoplasma gondii* Hsp90 is a potential drug target whose expression and subcellular localization are developmentally regulated, *J. Mol. Biol.*, 2005, 350, 723–734.
- 52 W. Bohne, C. A. Hunter, M. W. White, D. J. Ferguson, U. Gross and D. S. Roos, Targeted disruption of the bradyzoite-specific gene BAG1 does not prevent tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1998, 92, 291–301.
- 53 N. M. Silva, R. T. Gazzinelli, D. A. O. Silva, E. A. V. Ferro, L. H. Kasper and J. R. Mineo, Expression of *Toxoplasma gondii*-specific heat shock protein 70 during *in vivo* conversion of bradyzoites to tachyzoites, *Infect. Immun.*, 1998, 66, 3959–3963.
- 54 B. A. Fox, J. P. Cigley and D. J. Bizik, *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for *de novo* arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation, *Int. J. Parasitol.*, 2004, 34, 323–331.
- 55 W. Bohne and D. S. Roos, Stage-specific expression of a selectable marker in *Toxoplasma gondii* permits selective inhibition of either tachyzoites or bradyzoites, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1997, 88, 115–126.
- 56 B. Yahiaoui, F. Dzierzinski, A. Bernigaud, C. Slomianny, D. Camus and S. Tomavo, Isolation and characterization of a subtractive library enriched for developmentally regulated transcripts expressed during encystation of *Toxoplasma gondii*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1999, 99, 225–235.

1 57 L. A. Kirkman, L. M. Weiss and K. Kim, Cyclic nucleotide signaling in *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation, *Infect. Immun.*, 2001, **69**, 148–153.

58 M. S. Eaton, L. M. Weiss and K. Kim, Cyclic nucleotide kinases and tachyzoite-bradyzoite transition in *Toxoplasma gondii*, *Int. J. Parasitol.*, 2006, **36**, 107–114.

59 I. Popiel, M. Gold and L. Choromanski, Tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* T-263 in cell culture, *J. Eukaryot. Microbiol.*, 1994, **41**, 17S.

60 I. Popiel, M. C. Gold and K. S. Booth, Quantification of *Toxoplasma gondii* bradyzoites, *J. Parasitol.*, 1996, **82**, 330–332.

10 61 M. E. Jerome, J. R. Radke, W. Bohne, D. S. Roos and M. W. White, *Toxoplasma gondii* bradyzoites form spontaneously during sporozoite-initiated development, *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 4838–4844.

62 J. P. Dubey and J. K. Frenkel, Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts, *J. Protozool.*, 1976, **23**, 537–546.

63 T. D. McHugh, R. E. Holliman and P. D. Butcher, The *in vitro* model of tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*, *Parasitol. Today*, 1994, **10**, 281–285.

64 R. Evans, J. M. Chatterton, D. Ashburn, A. W. Joas and D. O. Ho-Yen, Cell-culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1999, **18**, 879–884.

65 D. J. P. Ferguson and W. M. Hutchinson, The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice, *Virchows Archiv A*, 1987, **411**, 39–43.

66 L. Jacobs, *Toxoplasma* and toxoplasmosis, *Adv. Parasitol.*, 1967, **5**, 1–45.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

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](#)