

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



Everson Reili De Souza Teles

Novas observações sobre os eventos iniciais da entrada do *Toxoplasma gondii*
em células hospedeiras

Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional

Área de concentração: Dos Sistemas Biológicos à Biomedicina Translacional

Linha de pesquisa: Bioimagem

Nível: Mestrado

Duque de Caxias
2022

Everson Reili De Souza Teles

Novas observações sobre os eventos iniciais da entrada do *Toxoplasma gondii*
em células hospedeiras

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em ciências biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley de Souza
Coorientadora: Dra. Juliana Portes

Duque de Caxias
2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

T269nTeles, Everson Reili De Souza.

Novas observações sobre os eventos iniciais da entrada do *Toxoplasma gondii* em células hospedeiras/ Everson Reili De Souza Teles. – Duque de Caxias, 2022.

92 f.: il.; 30.cm.

Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional)–Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2022.

“Orientador: Prof. Dr. Wanderley de Souza

Coorientadora: Prof.^a Dra. Juliana Portes”.

Referências: f. 84.

1. Biomedicina. 2. Protozoários. 3. *Toxoplasma gondii*. 4. Parasitos. 5. Células hospedeiras. I. Souza, Wanderley de. II. Portes, Juliana de Araujo. III. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. IV. Título.

CDD –610.28

(i) Aprovado com Ressalvas e Modificações

Comentários:

NÃO SE APLICA.

Presidente:



Agradecimentos

Aos Aos meus familiares, por todo amor carinho e confiança. Essa conquista é nossa!

À uma pessoa muito especial, meu irmão Ericles Jardel. Sem a sua cumplicidade não teria chegado onde cheguei. Tenho o privilégio de dividir todos momentos felizes com você.

Às minhas tias Aidê e Marilene, e aos meus primos. Eu tive muita sorte em ter vocês como Família. Não existem pessoas melhores.

À meu estimado orientador, professor Wanderley, obrigado pela oportunidade paciência, cuidado e ensinamentos.

À admirada Juliana Portes, por ter me ensinado, me ajudado, pela paciência comigo, pelo exemplo a ser seguido.

À professora Marlene. Obrigado por todos os seus conselhos, puxões de orelha, carinho e dicas neste trajeto.

Aos amigos Tatiana Araujo, Tatiana Guinancio, Thayane, Raphael. Pessoas maravilhosas com quem pude ter o prazer de conviver no laboratório.

Àos amigos Isabel, Larissa, Patricia, Nelson, Luan, Alessandra, Ana Caroline, obrigado por me apoiarem, adoro muito vocês.

Aos queridíssimos Ótávio, Noêmia, Sharmila e Verônica, pela ajuda nos momentos de grande necessidade, por fazerem momentos difíceis se tornarem fáceis, tenho admiração e carinho por vocês.

À Gustavo Miranda pelo apoio, e suporte e às professoras Narcisa e Rossiane pelo ambiente agradável e suporte que me foram muito úteis nessa caminhada.

Ào pessoal do CENABIO, que comemoram comigo cada conquista, pela contribuição que foi de vital importância no desenvolvimento dessa dissertação.

À Lane, que me faltam palavras para descrever a sua importância para essa conquista, por sempre acreditar em mim, quando nem eu mesmo acreditava. Minha eterna gratidão.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente o meu muito
Obrigado!

Este trabalho foi realizado sob a orientação dos doutores Wanderley de Souza e Juliana de Araujo Portes no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, no Instituto de biofísica Carlos Chagas Filho, na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Apoio Financeiro: CAPES, FINEP, CNPq e FAPERJ.

Resumo

INTRODUÇÃO: *Toxoplasma gondii* é protozoário intracelular obrigatório de ampla distribuição mundial, sendo eficaz no seu processo de invasão, com a capacidade de infectar uma grande variedade de animais vertebrados homeotérmicos de importância econômica. No Brasil a infecção por *T. gondii* é altamente prevalente em todas as regiões, afetando tanto humanos quanto animais domésticos. O processo de invasão do *T. gondii* nas células hospedeiras ocorre em menos de 20 segundos, pelo mecanismo ativo de penetração. É formada a junção móvel resultante da forte associação entre a extremidade apical do parasito e a superfície da célula hospedeira, secretando suas proteínas de adesão e ancoragem na membrana da célula hospedeira, levando à internalização do parasito em um vacúolo parasitóforo.

JUSTIFICATIVA: Compreender a interação inicial entre uma célula hospedeira e um parasito intracelular é essencial, pois, os determinantes envolvidos podem ser explorados como alvos de tratamentos para ajudar bloquear a infecção desde o início, contribuindo na formulação de propostas e soluções terapêuticas inovadoras.

METODOLOGIA: Foram utilizados taquizoítos da cepa RH e células da linhagem LLC MK2 e HFF. Através da sincronização em baixa temperatura dos eventos de entrada, optamos por realizar nossas análises após 15 minutos de interação, sem tratamentos, com o uso de citocalasina D e ensaios endocíticos. As análises incluíram o uso da microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de íons e microscopia de força atômica.

RESULTADOS: Observamos após sincronização dos eventos: participação da célula hospedeira na internalização do parasito, diminuição da entrada de *T. gondii* nas células hospedeiras tratadas com citocalasina D, inúmeras vesículas envolvidas durante o processo de entrada, e nanotubos projetados da célula hospedeira em direção ao parasito.

CONCLUSÃO: Observamos diversos eventos relacionados ao processo de invasão do parasito, desde nanotubos de tunelamento até intensa vesiculação associados ao processo de invasão.

Abstract

INTRODUCTION: *Toxoplasma gondii* is a mandatory intracellular protozoan of wide worldwide distribution, being effective in its invasion process, with the ability to infect a wide variety of homeothermic vertebrate animals of economic importance. In Brazil, *T. gondii* infection is highly prevalent in all regions, affecting both humans and domestic animals. The process of invasion of *T. gondii* in host cells occurs in less than 20 seconds, by the active mechanism of penetration. The mobile junction resulting from the strong association between the apical end of the parasite and the surface of the host cell is formed, secreting its binding and anchoring proteins in the host cell membrane, leading to the internalization of the parasite in a parasitophorous vacuole.

JUSTIFICATIVE: Understanding the initial interaction between a host cell and an intracellular parasite is essential, because the determinants involved can be explored as targets of treatments to help block the infection from the beginning, contributing to the formulation of innovative therapeutic proposals and solutions.

METHODOLOGY: Trophozoites of the RH strain and cells of the CLL MK2 and HFF strain were used. Through low temperature synchronization of input events, we chose to perform our analyses after 15 minutes of interaction, without treatments, with the use of cytochalasin D and endocytic assays. Analyses included the use of scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, ion microscopy and atomic force microscopy.

RESULTS: We observed after synchronization of the events: participation of the host cell in the internalization of the parasite, decreased entry of *T. gondii* into the host cells treated with cytochalasin D, numerous vesicles involved during the entry process, and nanotubes projected from the host cell towards the parasite.

CONCLUSION: We observed several events related to the process of invasion of the parasite, from tunneling nanotubes to intense vesiculation associated with the invasion process.

Lista de abreviaturas

µm - micrômetro

AIDS – Síndrome da imunodeficiência humana

AMA-1 – Antígeno de membrana apical 1

BSA - Albumina de soro bovino

CDC- Centro de controle e prevenção de doenças

CIM – Complexo interno de membrana

CENABIO - Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem

DMEM - Meio Eagle modificado por Dulbecco DNA – ácido desoxiribonucleico

GAC - Conector associado ao Glidossomo

GRA – Proteína de grânulo denso

GPI – glicosil – fosfatidil – inositol

HC – Célula hospedeira

HFF - Fibroblastos de prepúcio humano, do inglês *Human foreskin fibroblast*

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

JM – Junção móvel

LLC-MK2 - Células epiteliais de rim de macaco Rhesus (Macaca mulatta)

MIC – Micronema

MP – Membrana plasmática

MSP - Microtúbulos sub-peliculares

nm – Nanômetros

PBS - Solução salina tamponada de fosfato

pH – potencial de hidrogênio

VP – Vacúolo parasitoforo

ROP – Proteína de bulbo da rópria

RON – Proteína de pescoço da rópria

RPMI 1640 – Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1640

SAG – Antígeno de superfície

SRS – Sequência relacionado a SAG

SUS – Antígeno de superfície não relacionado

TgMyoA - moléculas de miosina do *T. gondii*

Lista de figuras

Figura 1. Processo de endodiogenia do taquizoíto.....	13
Figura 2: Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	14
Figura 3: Representação morfológica da forma evolutiva taquizoíta de <i>Toxoplasma gondii</i>	18
Figura 4. Citoesqueleto do complexo apical do taquizoíto	18
Figura 5. Desenhos esquemáticos de um taquizoíto e de um bradizoíto de <i>T. gondii</i>	23
Figura 6. A- Oocisto não esporulado; B- Oocisto esporulado contendo dois esporocistos	24
Figura 7: Junção móvel	25
Figura 8: Esquema da porção anterior de um taquizoíto de <i>T. gondii</i> reunindo o conhecimento atual sobre a organização estrutural e molecular do citoesqueleto	27
Figura 9: Vacúolo parasitóforo do <i>Toxoplasma gondii</i>	28
Figura 10. Análise do processo de interação do <i>T.gondii</i> com células da LLC MK2 por microscopia óptica.....	40
Figura 11. Células da linhagem HFF interagindo do <i>T. gondii</i> por 15 minutos..	41
Figura 12: Marcação anti-AMA1 do parasito interagindo com células da linhagem HFF.....	42
Figura 13: Células da linhagem HFF interagindo com o parasito, fixados após 15 minutos, marcação em verde nos filamentos de actina do citoesqueleto das células hospedeiras e AMA1 secretados pelo parasito em vermelho.....	42
Figura 14: Parasito interagindo com células da linhagem HFF, marcação anti- RON4 e actina da célula hospedeira.....	44
Figura 15. Aspecto morfológico do contato do taquizoíta em células hospedeiras por microscopia de íons.	45
Figura 16. Superfície da célula hospedeira em contato com o taquizoíto.....	46
Figura 17. Processo de entrada sequencial a adesão do taquizoíto nas células hospedeiras.....	47
Figura 18. Projeções de membrana envolvendo o taquizoíto no evento da entrada, por microscopia de íons.....	48
Figura 19. Aspectos morfológicos das células hospedeiras em contato com o <i>T. gondii</i>	49
Figura 20. Projeções finas, provavelmente nanotubos de tunelamento, envolvendo o taquizoíto.....	50
Figura 21. Nanotubos de tunelamento das células hospedeiras e o taquizoíto durante o reconhecimento.....	51
Figura 22. Aspectos da interação entre o parasito e a célula hospedeira.....	52
Figura 23. Morfologia da região de contato do taquizoíto com a célula hospedeira.....	53

Figura 24. Vesiculação durante a interação de taquizoito com a célula hospedeira.....	54
Figura 25. Células da linhagem LLC MK2 tratadas com citocalasina D por 30 minutos e que em seguida interagiram com <i>T. gondii</i> por 15 minutos após serem submetidos à sincronização de entrada.....	55
Figura 26. Gráfico com as dimensões das vesículas encontradas na região apical do <i>T. gondii</i> por MEV.....	56
Figura 27: <i>T. gondii</i> interagindo com células da linhagem LLC MK2 após sincronização dos eventos de entrada.....	57
Figura 28: Junção móvel após sincronização dos eventos de entrada.....	58
Figura 29: Endocitose da célula hospedeira próxima a junção móvel após sincronização dos eventos de entrada.....	59
Figura 30: Vesiculação durante a entrada do taquizóito na célula hospedeira após sincronização dos eventos de entrada.....	60
Figura 31: Morfologia da entrada do taquizóito na célula hospedeira após sincronização dos eventos de entrada.....	61
Figura 32: Morfologia das vesículas na região de entrada do taquizóito na célula hospedeira após sincronização dos eventos de entrada.....	62
Figura 33. Gráfico das dimensões das vesículas encontradas na região apical do <i>T. gondii</i> por MET.....	63
Figura 34 - Marcação com peroxidase para os processos endocíticos durante a interação células hospedeiras x <i>T gondii</i>	64
Figura 35. Endocitose da célula hospedeira da linhagem LLC MK2, marcada com ouro revestido por albumina.....	65
Figura 36. Marcadores de endocitose no taquizóito durante a interação com as células hospedeiras.....	66
Figura 37. Processos endocíticos da célula da linhagem LLC MK2 interagindo com <i>T. gondii</i> por 15 minutos após sincronização dos eventos de entrada.....	67
Figura 38: Ultraestrutura do <i>T. gondii</i> por AFM interagindo com células da linhagem LLC MK2.....	68
Figura 39: Projeção do conóide sobre a célula hospedeira por AFM.....	69
Figura 40: Contato inicial do taquizóito na superfície da célula hospedeira.....	69
Figura 41: Projeções de filopódios emitidos pela célula hospedeira nas regiões em contato com o parasito.....	70
Figura 42: Representação tridimensional de imagens de altura, durante a invasão do taquizóito, tal como visto usando sonda de ponta única.....	70
Figura 43: Projeções das células hospedeiras durante a entrada por AFM.....	71
Figura 44: Membrana da célula hospedeira envolvendo o taquizóitos por AFM.....	72
Figura 45: Superfície da célula hospedeira após varredura do parasito pela sonda.....	72

Sumário/Índice:

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	11
1.2. Taxonomia	11
1.3. Ciclo de vida e formas de infecção	11
1.4. Epidemiologia	13
1.5. Ultraestrutura do <i>Toxoplasma gondii</i> - Forma taquizoíta	17
1.5.1. Micronemas	19
1.5.2. Róptrias	19
1.5.3. Grânulos densos	20
1.5.4. Núcleo	20
1.5.5. Apicoplasto	21
1.5.6. Acidocalcisoma	21
1.5.7. Complexo de Golgi	21
1.5.8. retículo endoplasmático	21
1.5.9. Mitocôndria	22
1.6. Formas evolutivas	22
1.6.1. Bradizoíta	22
1.6.2. Esporozóitos e Oocistos	23
1.7. Mecanismos de invasão	24
1.8. Junção móvel	26
1.9. Participação da célula hospedeira no processo de entrada do <i>Toxoplasma gondii</i>	29
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	31
3.1. OBJETIVO GERAL	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Células hospedeiras	32
4.2. Parasitos	32
4.3 Interação parasito-células hospedeira	32
4.4. Microscopia óptica	33
4.5. Microscopia de fluorescência	33

4.6. Microscopia eletrônica de varredura	34
4.7. Microscopia de íons	35
4.8. Microscopia eletrônica de transmissão	36
4.9. Ensaio endocíticos	36
4.10. Microscopia de força atômica	38
5. RESULTADOS	39
6. DISCUSSÃO	73
6.1. Considerações iniciais	73
6.2. Sincronização do processo de entrada	73
6.3. Sincronização por baixa temperatura	73
6.4. Uso de citocalazina D	74
6.5. Análise microscópica do processo inicial da entrada	75
6.6. Marcações da superfície do <i>T.gondii</i> e incorporação dos traçadores pelo parasita.	81
CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um parasito pertencente ao filo Apicomplexa, assim como *Eimeria*, *Cryptosporidium*, *Babesia*, *Theileria* e outros. *T. gondii* é parasito intestinal de felídeos, seus hospedeiros definitivos, e é o agente causador da toxoplasmose, uma zoonose de grande importância médica e veterinária. O *T. gondii* foi descrito no Brasil por Splendore (1908) em coelho e por Nicolle e Manceaux (1908) no Norte da África, em um roedor (*Ctenodactylus gundi*). O *T. gondii* é protozoário intracelular obrigatório de ampla distribuição mundial, sendo eficaz no seu processo de invasão, com a capacidade de infectar uma grande variedade de vertebrados homeotérmicos, como aves e outros animais de importância econômica (Dubey *et al*, 1988).

1.2. Taxonomia

De acordo com sua classificação taxonômica, proposta por Adl e colaboradores (2012), *T. gondii* (do grego *toxon*= arco; *plasma* = molde) é classificado da seguinte maneira: supergrupo: Sar (Adl et al., 2012) ; infrareino: Alveolata (Cavalier-Smith, 1991); filo: Apicomplexa (Levine, 1970); classe: Conoidasida (Levine, 1988); subclasse: Coccidia (Leuckart, 1879); ordem: Eucoccidiorida (Leuckart, 1879); subordem: Eimeriorina (Leger, 1911); família: Sarcocystidae (Poche, 1913); gênero: *Toxoplasma* (Nicolle & Manceaux, 1909); espécie: *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909)

1.3. Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*

O *T. gondii* é um parasito heteroxeno, que possui sua fase assexuada em hospedeiros intermediários, como o homem e outros animais homeotérmicos, e sua fase sexuada em felídeos, seus hospedeiros definitivos (Dubey, 1998).. As principais formas infectivas deste parasito são os taquizoítas, bradizoítas (liberado dos cistos teciduais) e esporozoítas (contidos nos oocistos liberados nas fezes dos felídeos). Ao ingerir uma das formas infectivas, isso acarreta nos felídeos a reprodução assexuada e sexuada do parasito nas células epiteliais do intestino delgado. A fase sexuada (gametogênese) resulta na formação de

oocistos. Os oocistos produzidos pela fertilização dos macrogametas (gametas femininos) pelos microgametas (gametas masculinos) saem dos enterócitos infectados e são eliminados nas fezes (Dubey, 1998).

A infecção através da ingestão de oocistos é elevada, apontando para um papel importante dos gatos domésticos na disseminação do parasito entre seres humanos e outros animais domésticos e selvagens, dado que a carga ambiental de oocistos pode ser muito alta (Torrey & Yolken, 2013). A contaminação ambiental por estas estruturas apresenta grande relevância, já que oocistos podem permanecer viáveis no solo e na água por períodos superiores a um ano, principalmente em regiões tropicais, que são quentes e úmidas (Torrey & Yolken, 2013). Os oocistos podem contaminar fontes e reservatórios de água de abastecimento e, por serem resistentes aos métodos comumente utilizados para tratamento da água, podem continuar viáveis por longo período (Dumètre *et al.*, 2008). Outra fonte de infecção para hospedeiros suscetíveis é a ingestão de moluscos bivalves filtradores, como mexilhões, contendo oocistos esporulados (Eismerin *et al.*, 2010; Putgnani *et al.*, 2011), transfusão sanguínea, transplante de órgãos, acidentes laboratoriais e ingestão de leite de caprinos contaminado com taquizoítas (Dubey, 2006).

No meio externo, os oocistos passam por um processo de amadurecimento que varia de 2 a 5 dias, sofrendo a esporulação. Após esse processo os oocistos apresentam no seu interior dois esporocistos, cada qual com quatro esporozoítas, podendo contaminar água e alimentos ingeridos por aves e mamíferos (Dubey, 1998). Os felídeos, como já dito, são os hospedeiros definitivos do *T. gondii* e, portanto, os únicos nos quais ocorre tanto a fase assexuada quanto sexuada do complexo ciclo de vida deste protozoário. Nos hospedeiros intermediários (demais animais), ocorre apenas a fase assexuada. O ciclo que se divide em duas fases de vida distintos que vão variar de acordo com a fase da doença. A fase aguda caracteriza-se pela presença da forma taquizoíta, enquanto a fase crônica conta com a presença de bradizoítas e cistos teciduais (Dubey, 2006).

A destruição tecidual causada pela forma taquizoíta associada à resposta imune do hospedeiro irá promover as manifestações clínicas da doença (Dubey, 2006). Após a contaminação por via oral, o parasito penetra nas células epiteliais do intestino do hospedeiro formando no citoplasma destas

células vacúolos parasitóforos (VP) onde se diferenciam em taquizoítos. No interior destes VP, os taquizoítos se multiplicam rapidamente em um processo denominado endodiogenia, que consiste na formação de dois taquizoítos no interior de uma célula-mãe, que se degenera ao final do processo de divisão celular (Figura 1). Esta multiplicação ocorre rapidamente formando estruturas denominadas rosáceas e prossegue até que haja o rompimento da célula e a liberação dos parasitos para, então, infectar outras células. Na corrente sanguínea e no sistema linfático de vários tecidos os taquizoítos disseminam-se para muitos tecidos, incluindo o sistema nervoso central, olhos, músculo cardíaco e esquelético e placenta, levando, neste caso, à transmissão vertical (da gestante para o feto) durante a gravidez (Tender *et al.* 2000; Sibley, 2004).

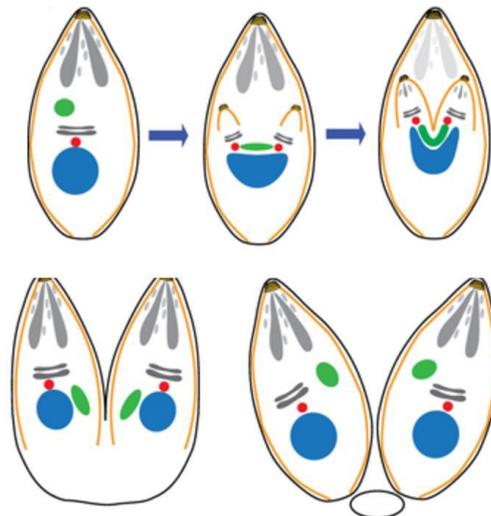


Figura 1. Processo de endodiogenia do taquizoíto. O complexo de Golgi é a primeira organela a se dividir, concomitantemente o centríolo na base do núcleo se divide e migra para a parte anterior das células se associando ao apicoplasto; os centríolos são responsáveis pela montagem do fuso mitótico. Os polos apicais das células-filhas são montados juntamente com os microtúbulos subpeliculares que vão sendo polimerizados. O complexo interno de membrana é montado e no final se associa à membrana plasmática da célula mãe. A última organela a migrar para as células-filhas é a mitocôndria (Adaptado de De Souza *et al.*, 2010)

A resposta imune do hospedeiro também modula o curso da infecção pelo *T. gondii*, os taquizoítas podem diferenciar-se em bradizoítas, de metabolismo baixo e lenta multiplicação, que formam cistos teciduais

particularmente no cérebro (Dubey *et al.*, 1998). Cistos teciduais podem persistir por longos períodos no hospedeiro, às vezes décadas, aparentemente protegidos do sistema imune e de terapias antiparasitárias. Ocasionalmente os cistos podem se romper, liberando os bradizoítos, que normalmente são destruídos pelo sistema imune (Dubey *et al.*, 1998).

Nos indivíduos imunossuprimidos, os bradizoítos podem se multiplicar de forma localizada ou se espalhar por diversos órgãos (Luft & Remington, 1992; Dubey, 1998). Os cistos teciduais caracterizam a fase final do ciclo assexuado nos hospedeiros intermediários, configurando uma importante fonte de contaminação para os humanos quando ingeridos na carne crua ou malcozida de animais infectados. Esta fase assexuada pode ser praticamente perpetuada nos hospedeiros intermediários através da cadeia alimentar (Figura 2) (Dubey, 1998).

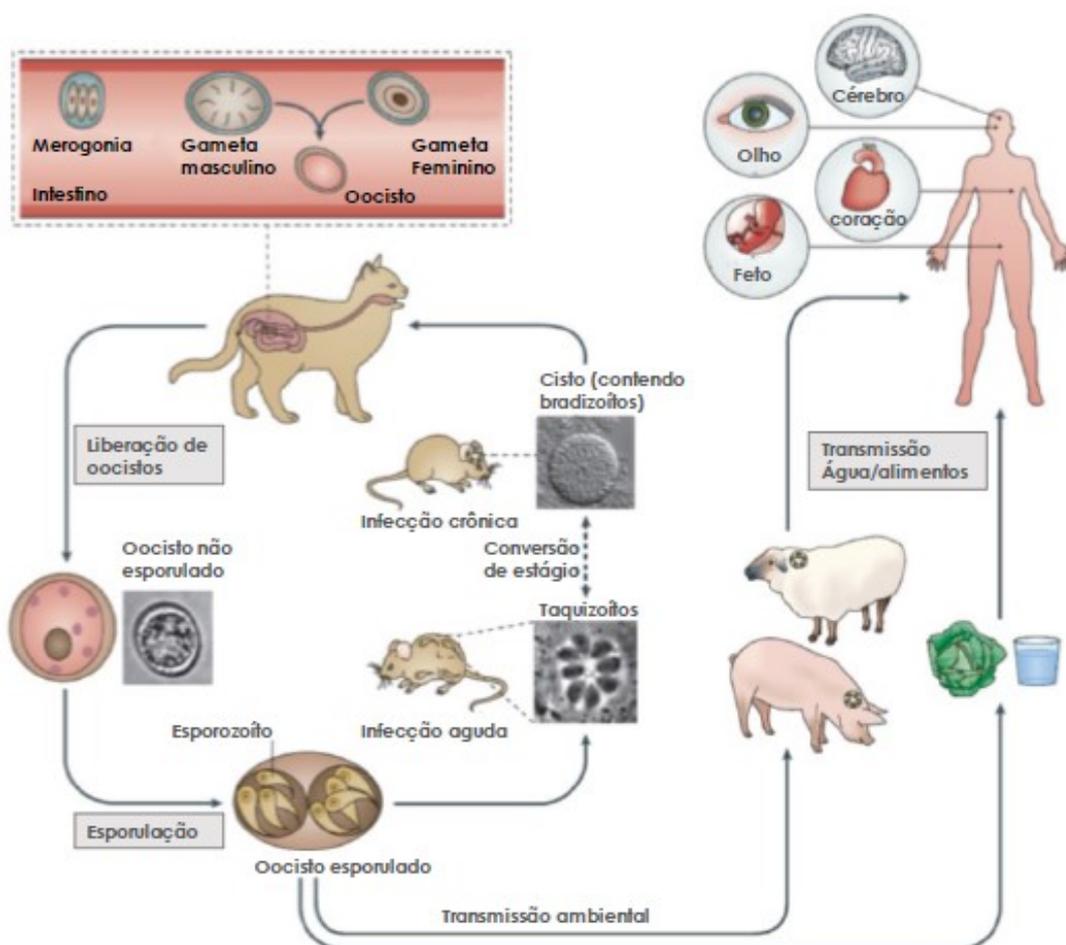


Figura 2: Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. O gato é o hospedeiro definitivo do *T. gondii* e através da eliminação de oocistos nas fezes,

acontece a contaminação do meio ambiente como solo, água e alimentos que podem ser ingeridos por outros animais e humanos. Os hospedeiros intermediários, como o homem, podem se contaminar diretamente por ingestão de oocistos ou por ingestão de carne contaminada contendo cistos com bradizoítas, transfusão de sangue ou órgãos. Mulheres grávidas infectadas também podem transmitir o parasito para o feto (Adaptado de Dubey, 1998).

1.4. EPIDEMIOLOGIA

No Brasil a infecção por *T. gondii* é altamente prevalente em todas as regiões, afetando tanto humanos quanto animais domésticos. Cerca de 60% da população é soropositiva para a toxoplasmose (CDC, 2020). Um dos grupos que configuram maior risco à toxoplasmose, são as mulheres não infectadas, que podem adquirir a doença durante a gravidez e assim transmitir para o feto (Dubey *et. al*, 2012). A morbidade por toxoplasmose congênita em humanos é muito alta, sequelas como cegueira em fetos bem como aborto em mulheres que foram infectadas com esse parasito durante a gravidez, são característicos da toxoplasmose (Dubey *et. al*, 2021). No Brasil dados clínicos obtidos nas últimas décadas mostraram que aproximadamente 35% das crianças infectadas por toxoplasmose congenitamente apresentaram doenças neurológicas, incluindo hidrocefalia, microcefalia e retardo mental, e aproximadamente 80% apresentaram lesões oculares (Dubey *et. al*, 2021) características da toxoplasmose.

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE-2015) há uma perspectiva de que nos próximos dez anos cerca de 2.649.396 nascidos vivos no Brasil tenham sido infectados com toxoplasmose. Se assumirmos a faixa de uma criança infectada por toxoplasmose congênita a cada 1000 nascimentos, são prováveis, portanto, o nascimento de 2649 crianças infectadas com toxoplasmose congênita anualmente no Brasil (IBGE-2015).

A toxoplasmose e o vírus da imunodeficiência humana / síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS) são os principais problemas de saúde pública global devido ao risco de reinfecção por *T. gondii*, que pode afetar

indivíduos imunossuprimidos. Apesar dos tratamentos profiláticos e eficazes para os casos de reativação da toxoplasmose, estudos revelaram que a toxoplasmose oriunda da reinfecção afeta persistentemente pacientes imunossuprimidos. Um estudo brasileiro avaliou a coinfeção HIV/AIDS com a toxoplasmose e concluiu que a neurotoxoplasmose foi a segunda infecção oportunista mais comum, com uma frequência de 11,2% (Moro & Moreira, 2020). A neurotoxoplasmose se manifesta clinicamente como uma doença subaguda que causa disfunção cerebral focal ou disfunção focal, combinada com sintomas de encefalite difusa. Os sintomas mais comuns incluem déficits motores focais, hemiparesia, ataxia, distúrbios sensoriais, distúrbios da fala, dor de cabeça intensa, convulsões, confusão mental, letargia e alterações visuais (Moro & Moreira, 2020).

Nos anos entre 1997 e 1999 em Campos dos Goytacazes, na região Norte do estado do Rio de Janeiro, os relatos de toxoplasmose levaram à realização de uma pesquisa sobre a prevalência da toxoplasmose e fatores de risco para infecção por *T. gondii*. Esta pesquisa mostrou que 84% da população em grupos socioeconômicos mais baixos, eram soropositivos, comparado com 62% e 23% da classe socioeconômica média e alta, respectivamente. A água não filtrada foi indicada como um fator de risco, revelando a importância da transmissão de oocistos através da água nessa região (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

A retinocoroidite ou toxoplasmose ocular é a lesão mais frequentemente associada à toxoplasmose, onde há o comprometimento ocular devido às lesões e cicatrizes causadas no fundo do olho. A patologia geralmente é assintomática e depende do sistema imune do indivíduo. As lesões podem ser bastante sérias, podendo levar à perda total da visão. Na cidade gaúcha de Erechim, município da região Norte do Rio Grande do Sul houve uma pesquisa realizada durante 2010 a 2020, revelou que 80% das 1.042 avaliadas eram soropositivas para toxoplasmose. Entre as pessoas soropositivas, 20% apresentaram lesões na retina, o maior índice registrado em todo o mundo, o que tornou essa cidade conhecida devido ao maior número de casos de infecção por toxoplasmose. De acordo com a pesquisa, na maioria dos casos a doença foi adquirida logo após o nascimento (Vaccaro, 2021).

Hábitos alimentares afetam as taxas de infecção pelo *T. gondii*. A ingestão de oocistos presentes em alimentos e água contaminados, ou ingestão de carnes ou seus derivados crus ou malcozidos, contendo cistos teciduais, e ainda por transmissão congênita, são os principais mecanismos envolvidos na infecção pelo *T. gondii* em animais homeotérmicos (Figura 2) (Wolf *et al.*, 1979).

1.5. ULTRAESTRUTURA DO *Toxoplasma gondii* – Forma taquizoíta

O *T. gondii* é uma célula eucarionte clássica com organelas e estruturas características. Contudo, possui algumas organelas específicas, como os apicoplasto e acidocalcissoma, e grânulos densos, róptrias e micronemas, que contribuem para uma invasão bem-sucedida (Figura 3). Como é característico do filo Apicomplexa, o *T. gondii* também apresenta uma camada pelicular tripla, formada pela membrana plasmática, intimamente associada ao complexo interno de membranas (revisto em Soldati & Meissner, 2004). A membrana plasmática é contínua ao longo do corpo do *T. gondii*. O complexo interno de membranas é um conjunto de cisternas achatadas, interrompido em alguns pontos, justaposto à membrana plasmática, que se estende desde o anel polar posterior, até a extremidade posterior do parasito (Cintra & De Souza, 1985).

Na região mediana do *T. gondii* encontra-se o microporo (Nichols *et al.*, 1994), medindo aproximadamente 150 nm de diâmetro. É formado por uma invaginação da membrana plasmática em uma região onde o complexo interno de membrana está interrompido, podendo estar envolvido na ingestão de macromoléculas. Foi sugerido que o microporo seja uma região especializada do retículo endoplasmático, pois foi detectada a atividade da enzima glicose-6-fosfatase no seu interior (De Melo & De Souza, 1997).

A forma taquizoíta de *T. gondii* mede de 2µm de largura a 8µm de comprimento, podendo variar de acordo com a fase do ciclo evolutivo, e possui região posterior arredondada e uma região apical afilada, onde localizam-se as estruturas e organelas que formam o complexo apical (revisto em De Souza *et al.*, 2010) (Figura 3).

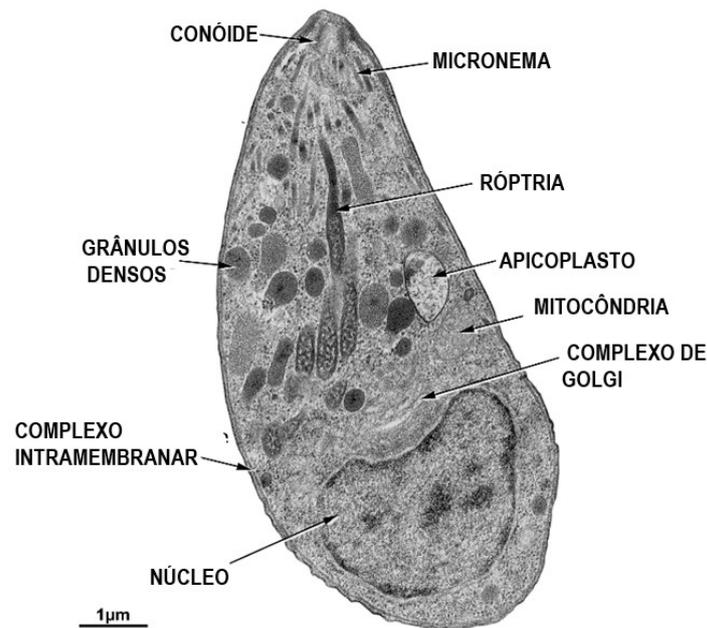


Figura 3: Representação ultraestrutural da forma evolutiva taquizoíta de *Toxoplasma gondii* demonstrando as principais organelas deste protozoário (Adaptado de: Attias *et al.* 2020).

O taquizoíta é caracterizado por ser uma célula polarizada, com um formato de arco, o que o nomeia. Tem como característica peculiar possuir um complexo apical na região anterior do corpo, uma estrutura cilíndrica em forma de cone, denominada conóide, composto pelo anel polar, anéis pré-conoidais, microtúbulos intraconoidais (Figura 4), e pelas organelas secretórias, as róptrias e os micronemas. O conóide pode se retrair, girar ou protundir independentemente do movimento do seu corpo (revisto em Morrissette e Sibley, 2002; revisto em De Souza *et al.*, 2010).

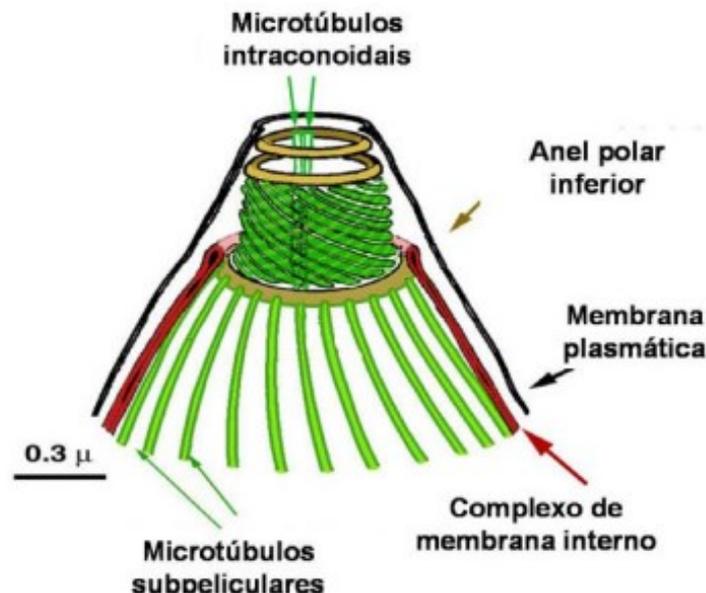


Figura 4. Representação esquemática do complexo apical do taquizoítio do *T. gondii* demonstrando estruturas do citoesqueleto desta região (adaptado de Hu *et al.*, 2006).

1.5.1 MICRONEMAS

Os micronemas são as organelas mais abundantes que compõem o complexo apical, tem formato de bastão e medem aproximadamente 50 nm de largura e 250nm de comprimento, sendo localizadas logo abaixo do conóide (Figura 3). Essas organelas são secretadas em um processo controlado pelo influxo intracelular de cálcio. Elas contêm um grande número de proteínas responsáveis pela movimentação e adesão do parasito às células hospedeiras (Carruthers & Tomley, 2008), bem como perforinas, proteínas importantes para o egresso dos taquizoítas. As proteínas secretadas por esta organela são denominadas MICs (proteína de micronema) e até o momento foram descritos pelo menos 19 tipos de MICs (incluindo MIC1-MIC12, AMA1, M2AP, SUB1, ROM1, SPATR, PLP1 e TLN4, (TgMIC1-4, TgMIC6-9, TgMIC12 e SPATR) (Wang & Yin 2015). Essas proteínas apresentam domínios adesivos, incluindo domínios semelhantes à integrina (MIC2), à trombospondina (MIC 1 e 2), à EGF (fator de crescimento epidermal) (MIC 6, 7, 8 e 9) e às lectinas (MIC3 e MIC 8), que medeiam interações com componentes da superfície da célula hospedeira, proporcionando o deslocamento do parasito, denominado de *gliding* (revisado em Carruthers & Tomley, 2008).

1.5.2 RÓPTRIAS

As róptrias também fazem parte do complexo apical formando um feixe de 8 a 12 organelas (Dubremetz, 2007). São alongadas, ricas em lipídeos, possuindo uma região chamada de bulbo e uma região conhecida como pescoço das róptrias, na porção anterior do conóide. As proteínas das róptrias são compartimentalizadas entre bulbo (identificadas como ROPs) e o pescoço (identificadas como RONs) e o mecanismo de secreção da organela ainda não estão totalmente elucidados. As RONs, são responsáveis pela formação da junção móvel e as ROPs, são responsáveis pelo estabelecimento do vacúolo parasitóforo, além de atuar como fatores de virulência do parasito (Besteiro *et al.*, 2011; Paredes-santos *et al.*, 2012). As róptrias são organelas com conteúdo ácido, apresentando pH entre 5 e 7 na róptria madura, enquanto róptrias em formação, apresentam pH variando entre 3,5 e 5,5 (Shaw *et al.*, 1998). Já foram descritas 29 proteínas no seu interior com localização diferenciada na organela: 24 localizam-se na porção basal (ROPs); e 5 estão presentes no pescoço (RONs) (Dubremetz, 2007)

1.5.3 GRÂNULOS DENSOS

Os grânulos densos estão distribuídos por todo o corpo celular, com forma esférica com um diâmetro médio de 0,2 μm e matriz uniformemente eletrondensa (Figura 3), cujo conteúdo é liberado de maneira característica durante todo o ciclo intracelular dos taquizoítas. Róptrias e micronemas secretam seu conteúdo pelo polo apical do parasito, enquanto os grânulos densos secretam pela região lateral e no polo posterior do corpo do parasito. As proteínas encontradas nesta organela são denominadas de GRAs e NTPases que são secretadas e endereçadas para o vacúolo parasitóforo, sendo responsáveis pela sua manutenção (GRA3, GRA5, GRA7 e GRA8). Outras proteínas dos grânulos densos, tais como GRA2, GRA4 e GRA6, compõem a rede intravacuolar (Mercier *et al.*, 2005) que, após a entrada do parasito na célula hospedeira proporciona o ambiente ideal para replicação do parasito, garantindo o seu estabelecimento durante a formação do vacúolo parasitóforo (Mercier *et al.*, 2005).

1.5.4 NÚCLEO

T. gondii tem o seu núcleo como o de outras células eucariontes, sendo limitado por um duplo envoltório e abrigando um único nucléolo. É esférico, e possui uma concavidade discreta em seu lado superior, onde o complexo de Golgi se acomoda. Está localizado na porção média do corpo celular, no caso do taquizoíta, e na região da extremidade posterior, e na extremidade basal nos bradizoítas. Durante a divisão, o núcleo assume a forma de ferradura, mantendo a integridade de sua membrana (Dubey *et al*, 1998).

1.5.5 APLICOPLASTO

O apicoplasto é alongado e delimitado por quatro membranas, com diâmetro médio de 210 nm. É uma organela de origem endossimbiótica e está intimamente associada ao complexo de Golgi e ao retículo endoplasmático. O apicoplasto contém um DNA de 35 kb e todo o maquinário que permite a síntese de algumas proteínas, além de desempenhar papéis essenciais em processos bioquímicos, como a síntese de ácidos graxos. Esta organela possui sua divisão acoplada à divisão do parasito e desperta muito interesse como alvo para quimioterapia (Macfadden, 2011).

1.5.6 ACIDOCALCISSOMO

Os acidocalcissomos são organelas que estão distribuídas por todo o citoplasma do parasito e estão envolvidas na regulação de cálcio e outros íons importantes, bem como a regulação do pH intracelular (Miranda *et al.*, 2008). O diâmetro dessa organela varia de 40 a 150 nm. É o local onde se estoca a maior parte do cálcio intracelular neste parasito e que é necessário para secreção de proteínas envolvidas com o processo de entrada (Moreno & Zhong, 1996).

1.5.7 COMPLEXO DE GOLGI

O Complexo de Golgi está intimamente aposto à porção côncava (anterior) do núcleo, exibindo 4 a 6 lamelas, vesículas revestidas e íntima associação com o centrossoma no momento da divisão. O complexo de Golgi se alonga e se divide logo no início do processo de endodiogenia do *T. gondii*, sendo distribuído entre as duas células filhas (Figura 1) (Attias, *et al* 2020).

1.5.8. RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

O *T. gondii* apresenta retículo endoplasmático rugoso e liso distribuídos por todo o corpo celular, sendo um sistema envolvido na síntese de proteínas e lipídeos, respectivamente. O reticulo endoplasmático do *T. gondii*, assim como o de outros eucariontes, está presente compondo a face externa do envoltório nuclear (Attias, *et al* 2020).

1.5.9. MITOCÔNDRIA

O *T. gondii* possui uma mitocôndria única que se apresenta de forma ramificada, podendo apresentar cerca de 10 µm de comprimento, com um grande número de cristas tubulares que sofrem leve constrição na região de fusão à membrana interna (Melo *et al.*, 2000).

1.6. FORMAS EVOLUTIVAS

1.6.1. BRADIZOÍTAS

Os bradizoítas formam cistos, característicos da fase crônica da toxoplasmose. Os taquizoítas convertem a bradizoítas em resposta ao sistema imune do hospedeiro (Dubey, 2007). Essa forma latente se replica mais lentamente e possui algumas características morfológicas em relação as outras formas, como núcleo localizado na parte posterior do corpo do parasito e um maior número de grânulos de amilopectina no citoplasma. Este polissacarídeo tem papel de reserva energética (Dubey, 2007). Organelas como róptrias e micronemas mudam sua distribuição e tamanho e se tornam mais densas e em maior número (Attias *et al.*, 2020) (Figura 5). Os cistos apresentam uma parede que é secretada desde o início da conversão dos bradizoítas e que irá manter a

integridade dos parasitos durante todo período de latência na célula hospedeira; eles podem conter até 1000 bradizoítas aproximadamente (Dubey, 1998). Desta forma, como a parede cística é uma provável barreira que dificultaria o acesso a fármacos, bem como às características do metabolismo mais lento do bradizoíta, ambos somados formam um obstáculo marcante para as pesquisas em quimioterapia anti-Toxoplasma (Paredes-Santos *et al.*, 2012).

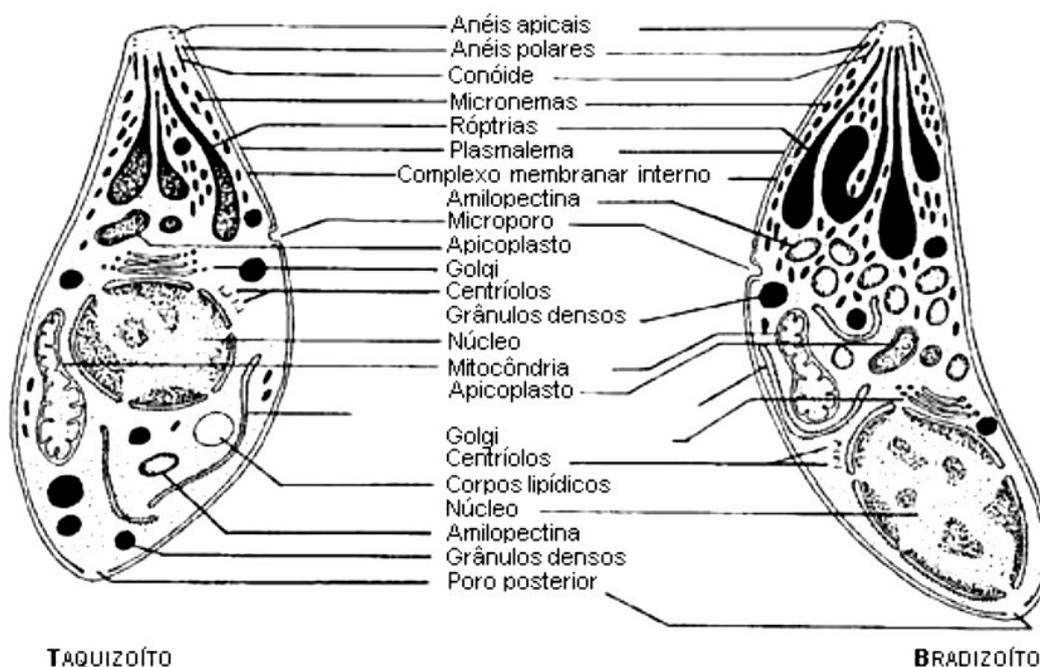


Figura 5. Desenhos esquemáticos de um taquizoíta e de um bradizoíta de *T. gondii*. Adaptado de Dubey *et al.* (1998).

1.6.2. ESPOROZOÍTOS E OOCISTO

Os oocistos são eliminados através das fezes dos felídeos (Robert-Gangneux & Dardé, 2012). A esporulação acontece aproximadamente em 4 dias no ambiente pelo contato com o oxigênio; cada oocisto contém dois esporocistos, que por sua vez contém 4 esporozoítos (Figura 6) (Dubey, 2007). Oocistos não esporulados possuem forma esférica com diâmetro de 10 x 12 μm , apresentando uma parede que consiste em duas camadas incolores e com o espora quase preenchendo todo o espaço do oocisto. Quando já esporulado são ovóides a elipsoidais, com diâmetro de 11 x 13 μm . Os esporozoítos possuem um tamanho de cerca de 8 μm de comprimento por 2 μm de largura e, ultraestruturalmente, são semelhantes aos taquizoítas, porém há uma

abundância de micronemas, róptrias e grânulos de amilopectina no primeiro. Os esporozoítos têm um núcleo na parte terminal do copo celular (Dubey, 1998).

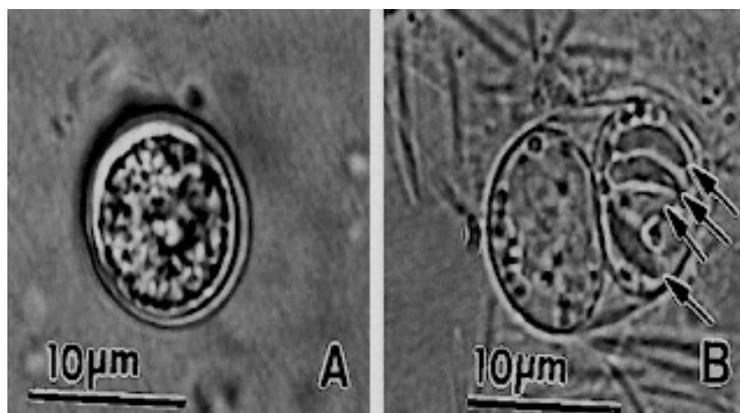


Figura 6. A- Oocisto não esporulado; B- Oocisto esporulado contendo dois esporocistos, onde em um deles 4 esporozoítos de *Toxoplasma gondii* podem ser vistos. (Dubey *et al.*, 1998)

1.7. MECANISMOS DE INVASÃO

Durante o processo de invasão, o *T. gondii* secreta um amplo espectro de proteínas a fim de estabelecer-se nas células hospedeiras, podendo até regular a expressão de proteínas do hospedeiro. Dentre as proteínas do parasito estão as: MICs, e as ROPs e GRAs (Hakimi *et al.*, 2017). Cada uma dessas proteínas, além de se localizarem em compartimentos distintos, são secretadas em momentos distintos do processo de invasão (Alexander *et al.*, 2005).

O processo de invasão tem início quando há contato entre o taquizoítos e a superfície da célula hospedeira. Neste primeiro momento ocorre a ligação de baixa afinidade entre moléculas expostas na superfície celular e proteínas ancoradas por glicosil—fosfatidil-inositol (GPI) presentes na membrana do parasito, como as SAGs (antígenos de superfície) e as SUSAs (SAG-antígenos de superfície não relacionados). Até o momento não há identificação de receptores específicos presentes na superfície celular que se ligam a estas moléculas superficiais do parasito. Uma dessas proteínas, a SAG3, é capaz de se ligar a heparan sulfato e outras glicosaminoglicanas (Carruthers *et al.*, 2008).

As MICs desempenham um papel importante na motilidade e adesão de *T. gondii*. As proteínas MIC1, MIC2, MIC4, MIC6 e em específico as MIC3 mostraram se ligar a alguns alvos na membrana das células hospedeiras durante o processo de invasão, como aldolase, glicose, ICAM-1, lactose e heparina (Azzouz *et al.*, 2013). Além disso, MIC2 secretada é crucial para a motilidade de *T. gondii*. Ao contrário das células que se movem através de cílios ou flagelos, o *T. gondii* depende das proteínas secretadas pelos micronemas que são incorporadas à membrana plasmática do taquizoíto e medeiam a adesão entre o parasito e a membrana da célula hospedeira. Secreção das MICs e RONS, formando um elo físico, conhecido como junção móvel (JM), que garante a internalização do *T. gondii* e posteriormente a formação de um vacúolo parasitóforo, que cria um ambiente propício para a replicação do parasito (Figura 7) (Besteiro *et al.*, 2011).

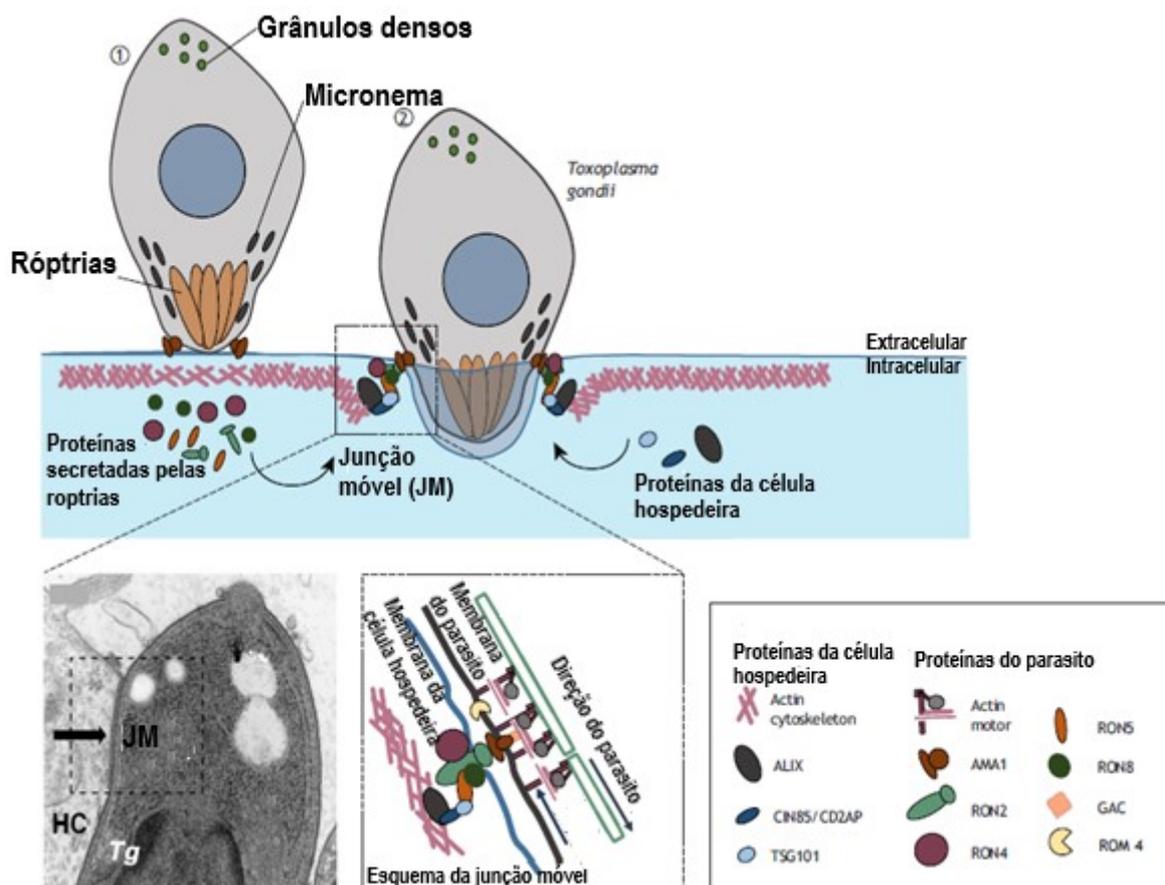


Figura 7: Junção móvel. O *T. gondii* invade as células formando uma junção compacta e móvel com membrana plasmática (MP) da célula hospedeira. (1) Secreção. Após a reorientação, o complexo apical do parasito se liga a superfície da membrana da célula hospedeira. Nessa região ocorre um

afrouxamento do citoesqueleto de actina da célula hospedeira que é induzido por proteínas secretadas do parasito. As proteínas da rópria são descarregadas na superfície da célula hospedeira. (2) formando a junção móvel. As proteínas secretadas pelo parasito e as proteínas da célula hospedeira formam um complexo multi-molecular. Isso é visto na micrografia eletrônica como uma região eletrondensa (seta preta) em uma célula hospedeira (HC; aqui, uma célula epitelial LLC-MK2) sendo invadida por um taquizoíto de (Tg). Esta é a região onde a junção móvel é formada. A projeção mostra uma representação esquemática da junção móvel. As proteínas da rópria (RON2, RON4, RON5 e RON8) formam um complexo molecular com a célula hospedeira (ESCRT ALIX, TSG101, CIN85 e CD2AP); isto ancora o parasito ao citoesqueleto de actina da célula hospedeira, enquanto o domínio extracelular de RON2 liga-se a AMA1 presente na MP do parasito. Dentro do parasito, o domínio citosólico de AMA1 se liga a um motor de actina-miosina do parasito através do conector associado ao glideossomo (GAC), enquanto a protease RON4 é secretada sucessivamente o complexo para permitir o movimento do parasito. CIM, complexo interno de membrana (Adaptado de Horta *et al*, 2020).

1.8. JUNÇÃO MÓVEL

O processo de invasão do *T. gondii* nas células hospedeiras ocorre em menos de 20 segundos, pelo mecanismo ativo de penetração (Figura 7). É formada a junção móvel resultante da forte associação entre a extremidade apical do parasito, secretando suas proteínas de adesão e ancoragem na membrana da célula hospedeira, levando à internalização do parasito em um vacúolo parasitóforo, vistos pela primeira vez por micrografias eletrônicas de transmissão de merozoítos de *Plasmodium* invadindo eritrócitos (Aikawa, *et al* 1977), bem como esse mecanismo de formação da junção móvel em taquizoítos de *Toxoplasma* (Porchet-Hennere & Torpier 1983). Durante esse processo de internalização, *T. gondii* recruta parte da membrana da célula hospedeira para formar a membrana do vacúolo parasitóforo. Ao formar essa junção transitória (Figura 7), o parasito sofre uma constrição, deformando seu

corpo. Ele suporta esta constrição devido à associação dos microtúbulos subpeliculares, rede subpelicular e a película (Cintra & De Souza, 1985).

A MIC principalmente implicada neste processo é denominada de antígeno de membrana apical 1 (AMA1) que interage com RON2 para formar uma junção móvel que conta ainda com a participação de RON4, RON5 e RON8 (Besteiro *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2019). MICs também se conectam a domínios citoplasmáticos estabelecendo conexões com a F-actina do parasito que interage com a miosina TgMyoA e o complexo intramembranar do *T. gondii* (Figura 8). A miosina promove o deslizamento dos filamentos de actina para a extremidade posterior do parasito, o que desloca o IMC ligado a esses filamentos, fazendo com que o parasito avance em direção ao vacúolo endocítico (Opitz & Soldati 2002). Esse mecanismo exclusivo, chamado *gliding*, é composto por um sistema de actina-miosina subjacente à membrana plasmática. O glideossoma promove a motilidade de deslizamento dependente do substrato bem como a entrada ativa da célula hospedeira e a saída das células infectadas. Especificamente, o complexo MIC2-M2AP está envolvido nesse processo de mobilidade conhecida como *gliding* (Carruthers, 2006).

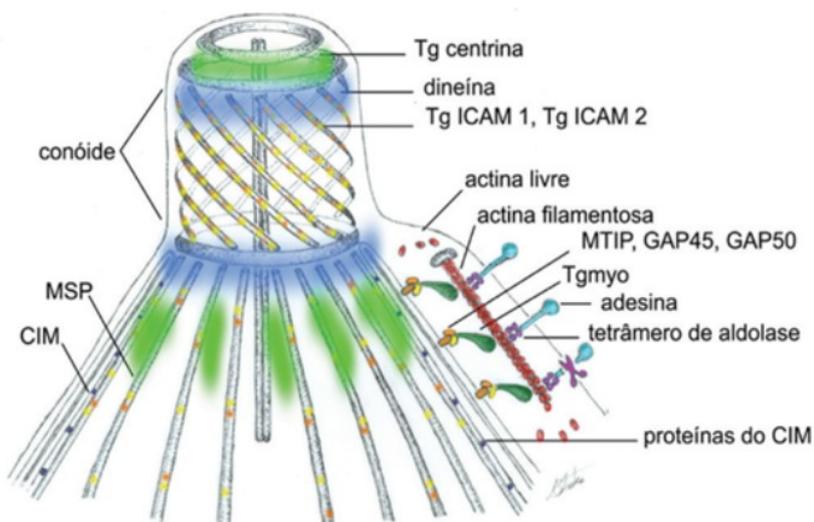


Figura 8: Esquema da porção anterior de um taquizoíta de *T. gondii* reunindo o conhecimento atual sobre a organização estrutural e molecular do citoesqueleto. A presença de Tg centrina, ICAM 1 e 2 foi confirmada, entretanto sua interação estrutural com outros componentes do citoesqueleto ainda não foi

determinada. Tg centrina está presente na região dos anéis polares apicais e em pontos distribuídos abaixo do anel polar (regiões sombreadas), enquanto a marcação para dineína foi positiva tanto no topo quanto na base do conóide. ICAM 1 e 2 se dispõem em consonância com as fibras espiraladas do conóide e ao longo dos microtúbulos sub-peliculares (MSP). As moléculas envolvidas no deslizamento (*gliding*) estão representadas à direita, onde a escala real entre a membrana plasmática e o Complexo Interno de Membranas (CIM) foi desconsiderada para permitir a representação das diversas moléculas já identificadas (Adaptado de Attias & De Souza, 2010).

O Vacúolo parasitóforo (VP) (Figura 9) fornece um ambiente estável para a multiplicação do parasito, pois não se funde com outras estruturas da célula hospedeira, incluindo os lisossomos, evitando a sua acidificação (Dubey, 2007). O crescimento do VP promove uma reorganização do citoesqueleto da célula hospedeira ao seu redor (Dubey, 2007). Confinado na célula hospedeira, o *T. gondii* está não apenas protegido do sistema lisossomal da célula hospedeira, mas também pode dispor de uma fonte de nutrientes imediatos. A membrana do VP é uma estrutura porosa que permite a passagem de moléculas de até aproximadamente 1300 Da, como açúcares, aminoácidos e co-fatores, do citoplasma da célula hospedeira para o espaço intravacuolar. Estudos indicam que os poros sejam importantes para a aquisição de purinas em forma de ATP do citosol da célula hospedeira (Besteiro *et al.*, 2011).

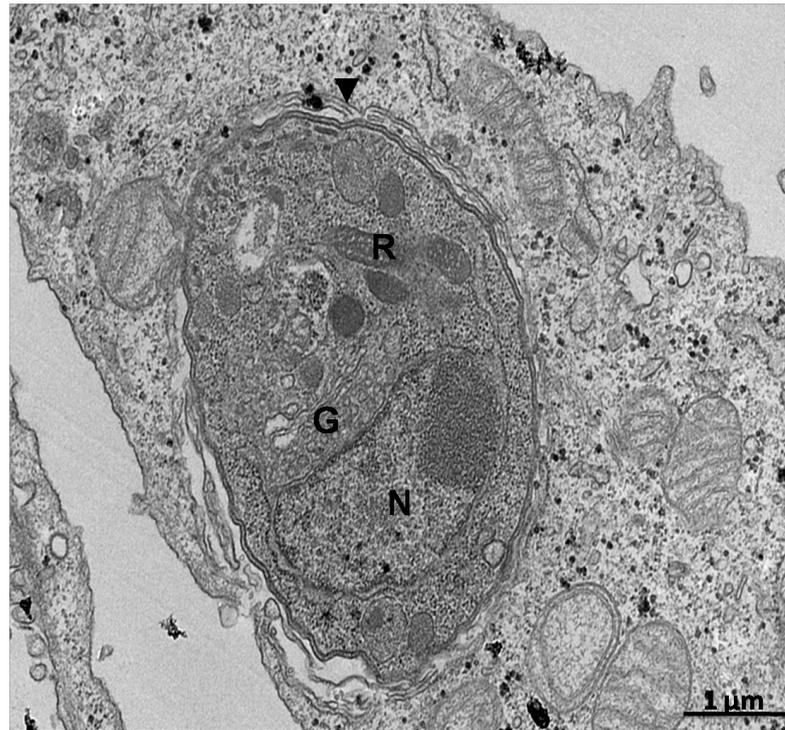


Figura 9: Vacúolo parasitóforo do *Toxoplasma gondii*. Micrografia eletrônica do vacúolo parasitóforo do *Toxoplasma gondii* mostrando a róptria (R), o complexo de Golgi (G) e o núcleo (N).

1.9. PARTICIPAÇÃO DA CÉLULA HOSPEDEIRA NA ENTRADA DO *T. GONDII*

A fim de manter uma vida intracelular, o *T. gondii* desenvolveu várias maneiras de invadir e neutralizar as estratégias impostas pela célula hospedeira. Estudos recentes, ensaios com uso de bloqueadores de processos endocíticos, demonstram também o papel importante e ativo da célula hospedeira no processo de interação do *T. gondii* com células hospedeiras HFF, fibroblastos de prepúcio humano e macrófagos intraperitoniais de camundongo, resultando no bloqueio parcial da entrada do parasito (Portes *et al* , 2020).

A entrada do parasito também pode ocorrer, por meio dos processos fisiológicos da célula hospedeira, como por exemplo, através dos mecanismos fagocíticos. A fagocitose é um tipo de endocitose descrita em diversos modelos como via de entrada de patógenos intracelulares em células hospedeiras, como protozoários, vírus e bactérias (Sibley & Andrews, 2000). Este evento tem sido

relatado para a entrada de parasitos como *Trypanosoma cruzi* (Fernandes *et al.*, 2011) e mais recentemente *Leishmania amazonensis* (Cavalcante-Consta *et al.*, 2019).

Ao contrário do que ocorre durante a invasão por penetração ativa, na qual o *T. gondii* reorienta-se e sua parte apical entra em contato com a membrana da célula hospedeira, formando, posteriormente, a JM, na entrada por fagocitose ainda não se sabe se há secreção de proteínas pelo parasito (Morisaki *et al.*, 1995). Após internalização, forma-se um vacúolo largo ao redor do parasito, vacúolo este que se converte em fagossomo, ao qual, posteriormente, fundem-se lisossomos, que por liberarem diversas enzimas hidrolíticas são capazes de destruir o parasito (Dobrowolski & Sibley, 1997; De Souza & Attias, 2015).

Contudo, alguns autores (Coppens *et al.*, 2006) já descreveram que esses protozoários são capazes de resistir à degradação via processos fagocíticos e inibir a fusão dos lisossomos ao VP, podendo assim sobreviver no interior das células hospedeiras.

As citocalasinas são um grupo de metabólitos fúngicos secundários que afetam diversas funções celulares, dentre as quais a inibição da fagocitose. A citocalasina D é um inibidor da polimerização de actina, uma proteína altamente conservada do citoesqueleto e que tem participação fundamental no processo de fagocitose (Ryning & Remington, 1978). Estudos demonstraram que esse inibidor foi capaz de bloquear o *gliding* do *T. gondii*, impedindo a infecção de células fagocíticas e não fagocíticas, demonstrando assim a necessidade de mobilidade do parasito para o êxito na invasão das células (Ryning & Remington, 1978). Posteriormente, Dobrowolski e Sibley (1996) demonstraram que a invasão depende da actina do parasito e não da actina da célula hospedeira. A participação do citoesqueleto da célula hospedeira na infecção pelo *T. gondii* permanece controversa. O pré-tratamento de neutrófilos e eosinófilos com citocalasina D inibe significativamente a internalização de *T. gondii*, assim como a incubação prévia dos parasitos com a droga também é capaz de inibir a penetração nestas células (MacLaren & De Souza, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de inúmeros estudos sobre a interação do *Toxoplasma gondii* com a célula hospedeira ainda faltam conhecimentos básicos sobre os eventos iniciais, especialmente no que concerne a aspectos estruturais em alta resolução. Compreender a interação inicial entre uma célula hospedeira e um parasito intracelular é essencial, pois, os eventos envolvidos podem ser explorados como alvos de tratamentos para ajudar bloquear a infecção desde o início, contribuindo na formulação de propostas e soluções terapêuticas inovadoras. Tendo em vista a existência de diferentes possíveis processos de invasão do parasito, buscamos descrever em maior detalhe os eventos associados ao processo de invasão.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar aspectos ultraestruturais do processo de entrada natural do *Toxoplasma gondii* nas células hospedeiras, avaliando também a participação de citoesqueleto de actina no processo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Caracterizar os aspectos morfológicos do processo de interação do *T. gondii* com células hospedeiras através de microscopia de fluorescência utilizando marcadores de citoesqueleto da célula hospedeira e marcadores das proteínas AMA1 E RON4 secretadas pelo *T. gondii* durante a invasão.

3.2.2. Avaliar a ultraestrutura do processo de interação do *T. gondii* com células hospedeiras através de microscopia eletrônica de varredura e transmissão de alta resolução

3.2.3. Caracterizar a região de entrada do parasito na célula hospedeira por microscopia de varredura por íons.

3.2.4. Caracterizar a região de entrada do parasito na célula hospedeira por microscopia de força atômica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Células hospedeiras

Foram utilizadas duas linhagens de células hospedeiras distintas: células epiteliais de rim de macaco *Rhesus* (*Macaca mulata*), LLC-MK2 (ATCC – CCL7, Rockville, MD/EUA), cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e a linhagem celular de fibroblastos de prepúcio humano, HFF1 (do inglês *Human foreskin fibroblast*) cultivadas em foram cultivados em meio Eagle modificado por Dulbecco completo (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Hyclone, Logan, UT), 1% de estreptomicina e penicilina e 2mM de L-Glutamina (Sigma). Ambas cultivadas em garrafas de cultura e mantida a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂.

4.2. Parasitos

Taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH foram mantidos por passagens em células LLC-MK2 em confluência. Após 2 ou 3 dias da infecção, os parasitos obtidos do sobrenadante foram centrifugados a 1000 x g durante 10 minutos, ressuspensos em 10 ml de meio RPMI, e o número de parasitos foi quantificado em câmara de Neubauer.

4.3. Interação parasito-célula hospedeira

Um dia antes da realização dos experimentos de interação, foram plaqueadas 5×10^5 células em lamínulas redondas estéreis numa placa de 24 poços ou distribuídas em frascos de cultivo de 25 cm². Em seguida, as células foram lavadas por 3 vezes com solução salina de tampão fosfato (PBS pH 7,2) e os parasitos foram adicionados em uma relação 50:1 (parasitos: célula). Posteriormente, as células foram submetidas à temperatura de 4°C durante 30

minutos, para sincronização da invasão pelo parasito. Depois, as células foram colocadas na estufa a 37°C e incubadas por aproximadamente 19 minutos, assim a temperatura do meio em torno de 20° C, o protozoário volta a ter a mobilidade e interação com célula, e com isso há uma sincronização nos eventos da entrada do protozoário na célula hospedeira. Após os tempos iniciais da interação de 5, 15 e 30 minutos, as amostras foram fixadas para análise por microscopia óptica em solução contendo formaldeído a 4% em PBS ou para análise por microscopia eletrônica em solução contendo glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1M. A fim de observar a influência do citoesqueleto de actina da célula hospedeira nos eventos de entrada, as células hospedeiras foram pré-incubadas com citocalasina D a 10 µM (Caldas, *et al.* 2013) por 30 minutos antes da infecção pelo parasito tal como descrito acima.

4.4. Microscopia óptica

O perfil de infecção por parasitos foi avaliado pelos índices de adesão e internalização. O experimento de interação foi feito conforme no item acima, e em seguida as células foram fixadas em solução de formaldeído 4% em PBS pH 7,2, coradas com corante Giemsa 10% em água destilada, desidratadas em diferentes concentrações de acetona-xilol: 1) 100% acetona; 2) 100% acetona; 3) 70% acetona e 30% de xilol; 4) 30% acetona e 70% de xilol; 5) 10% acetona e 90% de xilol; 6) 100% de xilol. Após desidratação, as lamínulas foram montadas sobre gotas de Entellan e analisados ao microscópio óptico. A porcentagem de LLC MK2 infectadas e o número médio de parasitas intracelulares foram determinados após o exame de pelo menos 400 células. O índice de aderência foi calculado multiplicando os dois indicadores. Para o cálculo dos índices de adesão e internalização, utilizou-se as fórmulas descritas: o índice de adesão é obtido multiplicando-se o número médio de parasitos aderidos por célula hospedeira e a porcentagem de células com parasitos aderidos e o índice de internalização é calculado multiplicando-se o número médio de *T. gondii* intracelulares por célula infectada e a porcentagem de células infectadas (Seabra *et al.*, 2004).

4.5. Microscopia de fluorescência

Para análise por microscopia de fluorescência, foi realizada interação conforme descrito no item “4.3. interação parasito-célula hospedeira”. Após diferentes tempos de interação, as células foram fixadas em solução contendo 4% de formaldeído em tampão de fosfato de sódio, pH 7,2, por 20 minutos, lavadas com PBS (pH 7,2), permeabilizadas em solução contendo saponina a 0,05% e albumina de soro bovino (BSA) a 3% em PBS por 10 minutos. Posteriormente as amostras foram incubadas com solução contendo 50 mM de Cloreto de Amônio (NH₄Cl) em PBS por 30 minutos, e depois incubadas com solução de bloqueio (saponina a 0,05% e BSA a 3% em PBS) por 30 minutos em temperatura ambiente. As células foram incubadas com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-AMA1 (diluição 1:2000), ou anticorpo primário monoclonal de coelho anti-RON4 (diluição 1:100) (gentilmente cedido pela Dra. Dominique Soldati, Universidade de Genebra, Genebra, Suíça) por 1h, protegido da luz. Posteriormente, as células foram lavadas com solução de bloqueio e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho Alexa Fluor 546 (diluição 1:800) (Molecular Probes) por 1h ao abrigo da luz. Após incubação, as células foram lavadas com solução de bloqueio e as amostras foram incubadas por 1h com faloidina fluorescente 488 (diluição 1:1000) (Molecular Probes), um peptídeo fúngico que se liga aos filamentos de actina do citoesqueleto das células, montadas com o reagente “ProLong® Gold antifade” (Invitrogen) com 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI). As observações foram feitas utilizando o microscópio confocal LSM 710 ZeissElyra PS.1.

4.6. Microscopia eletrônica de varredura

Para a análise morfológica dos eventos iniciais da interação por microscopia eletrônica de varredura, foi realizada a interação, conforme descrito no subitem 4.3. interação parasito-célula hospedeira. As amostras foram fixadas após 15 minutos de interação em solução contendo 2.5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.4, lavadas com tampão cacodilato de sódio de 0,1 M e pós-fixadas por 1h em solução contendo 1% de tetróxido de ósmio em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, protegidas da luz. Foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol

(de 30 a 100%), por 10 minutos em cada etapa, secas usando ponto crítico de CO₂ e montadas em *stubs*. As lamínulas foram submetidas ao método da decapagem a seco que consiste na remoção mecânica com o uso de fita adesiva, da membrana plasmática, promovendo a exposição do interior celular (Magno *et al*, 2004). As amostras foram revestidas com platina (5 nm) e observadas ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss Auriga 40 na Unidade Multiusuário do Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO) da UFRJ.

4.7. Microscopia de íons

Para a análise morfológicas dos eventos iniciais da interação por microscopia eletrônica de varredura, foi realizada a interação, como descrito no subitem 4.3. interação parasito-célula hospedeira . As amostras foram fixadas após 15 minutos de interação em solução contendo 2.5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.4, lavadas com tampão cacodilato de sódio de 0,1 M e pós-fixadas por 1h em solução contendo 1% de tetróxido de ósmio em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, protegidas da luz. Foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (de 30 a 100%), por 10 minutos em cada etapa, secas usando ponto crítico de CO₂ e montadas em *stubs*. O material não passou pela etapa de metalização, e por se tratar de amostras biológicas não condutoras foi utilizado o flood gun com o objetivo de neutralizar o efeito de carga. As imagens foram adquiridas usando 35 kV em um microscópio de varredura de íons de Hélio modelo ORION, produzido pela Nanofab da Zeiss, com filamento de tungstênio operado a tensão constante, com distância de trabalho de 8,0–13,0 mm, com filamento de tungstênio operado a tensão constante, diâmetro de abertura de 5 µm; controle spot # 5 e pressão He de 5.5E6 Torr. Para compensação de carga positiva, a amostra foi irradiada adicionalmente com elétrons usando o chamado flood gun. Uma vez que o feixe chega ao fim da linha, o detector de elétrons (detector de Ewerhart-Thornley) é “desligado” e o elétron feixe é direcionado para a superfície da amostra por uma quantidade especificada de tempo. As imagens foram formadas a partir da detecção de elétrons e construído como uma matriz de 2048 X 2048 pixels (De Souza & Attias, 2015), no Núcleo do Laboratório de

Microscopia do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro).

4.8. Microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise ultraestrutural dos eventos iniciais da interação por microscopia eletrônica de transmissão, foi realizada a interação, como descrito no subitem 4.3. interação parasito-célula hospedeira. As amostras foram fixadas após 15 minutos de interação com solução contendo glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4. As células foram removidas mecanicamente com o auxílio de raspador de células, lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pós-fixadas por 1h em solução contendo 1% de tetróxido de ósmio em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, protegidas da luz. O material foi lavado no mesmo tampão, desidratados em concentrações crescentes de acetona (de 30 a 100%), por um período de 20 minutos em cada etapa. A infiltração em resina epóxi foi feita gradualmente com misturas de acetona: Epon 2:1 por 6 h, 1:1 e 1:2 por 8 h e resina pura por 12 h, posteriormente o material foi colocado em moldes e polimerizado na estufa a 60°C, por 72 h. Depois de polimerizados, os blocos foram trimados, seccionados com o auxílio de uma faca de diamante (Drukker, Reino Unido) no ultramicrótomo Leica (Alemanha) ULTRACUT UCT7, cortes pratas de 70 a 75 nm, coletados em grades de cobre de 300 mesh. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 5% em água por 40 minutos lavados 3 vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e em seguida incubados em citrato de chumbo por 5 minutos lavados 3 vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, secos a temperatura ambiente e posteriormente observados no microscópio eletrônico transmissão HITACHI HT 7800 que opera com fonte de elétrons de Hexaboreto de Lantânio ou de Tungstênio, em voltagem de aceleração de 80-120 kV, em alto contraste, na unidade multiusuário do Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO) da UFRJ.

4.9. Ensaios endocíticos

Foram utilizados dois traçadores clássicos de endocitose: albumina acoplada a partículas de ouro coloidal (Sloth e Geuse, 1985) e peroxidase de rabanete

(HRP) cuja atividade enzimática pode ser detectada por métodos citoquímicos. Partículas de ouro coloidal com diâmetro de 15 nm, foram preparadas seguindo o seguinte protocolo descrito por Sloth e Geuse (1985): Aqueceu-se até a ebulição 200ml de água deionizada em um Erlenmeyer, com agitação. Adicionou-se 2,5ml de solução de ácido tetracloro-áurico 1%, logo após foi acrescentado rapidamente 7,5 mL de solução 1% de citrato de sódio e manteve-se a solução em ebulição, tampada com um vidro de relógio, por 10 min, mantendo-se a agitação. Decorrido esse tempo, o aquecimento do sistema foi suspenso e a agitação mantida por mais 15 min em outra placa de agitação, porém sem aquecimento. A barra magnética foi, então, removida e a solução foi resfriada à temperatura ambiente. Obteve-se imediatamente o espectro eletrônico da suspensão resultante. A complexação da albumina ao ouro coloidal: 250 µl da solução de proteína (1 mg/ml) foram adicionados a 10 ml da solução de ouro coloidal em tubos cônicos e adicionado ainda 1 ml de polietilenoglicol (PEG) a 1%. Esses tubos foram centrifugados durante 45 min a 4°C a 65000g sem a utilização de sistema de frenagem da centrífuga para não haver mistura dos sedimentos. Após a centrifugação houve a formação de dois sedimentos, um no fundo dos tubos correspondente ao material complexado proteína-ouro, e outro na parede do tubo correspondente às partículas de ouro não complexadas. O sedimento da parede e o sobrenadante foram então descartados e o sedimento do fundo do tubo foi ressuspenso em 1 ml de PBS pH 7,2 e estocado a 4°C. Para os experimentos as células foram incubadas nos tempos em que foi realizada a interação, como descrito no subitem 4.3. interação parasito-célula hospedeira. As soluções de ouro foram diluídas 1:5 em solução de Ringer pouco antes dos procedimentos experimentais (absorvância a 520 nm). Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7.2, e processadas também para microscopia eletrônica de transmissão (MET). No caso da peroxidase de rábano (HRP tipo II, Sigma Chemical Company, EUA) as incubações foram realizadas em meio contendo 1mg/ml de HRP por 1 hora, em seguida as células foram lavadas em PBS, pH 7,5 para remoção do excesso de peroxidase. Logo após as células foram fixadas em glutaraldeído 1% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7.2 por q hr, lavadas e ,incubadas durante 60 minutos em meio com 5mg de diaminobenzidina,

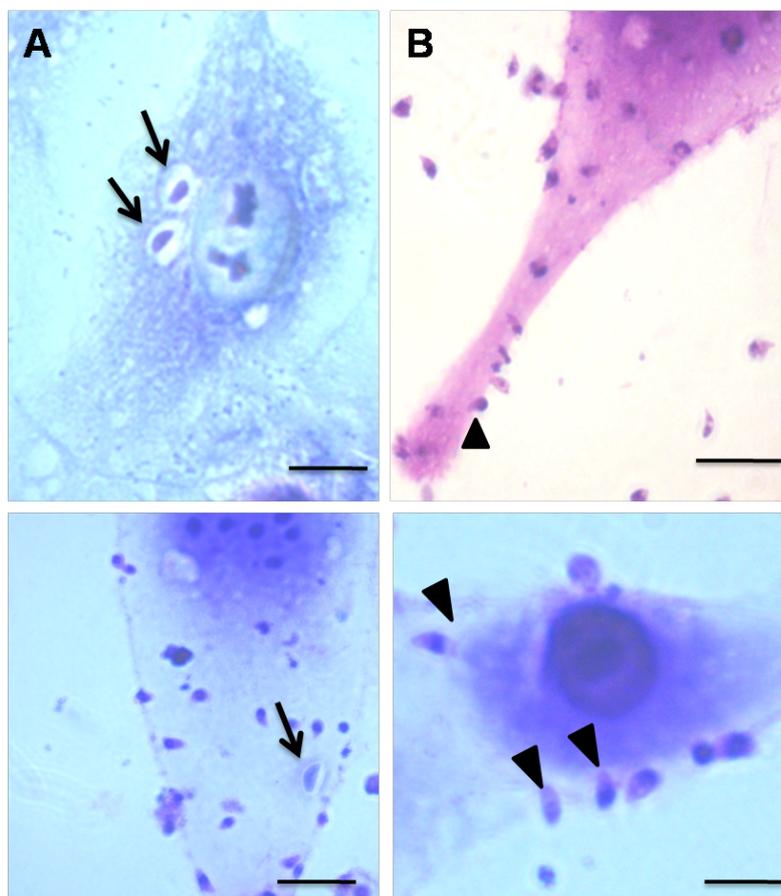
tampão Tris-HCl, pH 7,6 e água oxigenada 0,01%. Em seguida foram lavadas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio e processada para microscopia eletrônica de transmissão (MET), conforme descrito no subitem 4.3. interação parasito-célula hospedeira.

4.10. Microscopia força atômica

Para a análise morfológica dos eventos iniciais da interação as células foram distribuídas em lamínulas redondas estéreis numa placa de 24 poço se infectadas com o parasito *T. gondii*, conforme descrito no subitem 4.3. interação parasito-célula hospedeira, após a sincronização da entrada as células foram fixadas. As amostras foram fixadas em solução contendo 1% de glutaraldeído e 4% de formaldeído em tampão de fosfato de sódio, pH 7,2, por 1h, lavadas com PBS (pH 7,2), e pós-fixadas por 1h em solução contendo 1% de tetróxido de ósmio em tampão de tampão de fosfato de sódio, protegidas da luz. As células foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (de 30 a 100%), por 10 minutos em cada etapa, secas usando ponto crítico de CO₂. As imagens foram obtidas à temperatura ambiente em Microscópios de Varredura por Sonda, modelo Bruker Dimension Icon. Foram utilizados cantilêveres com constante de mola variando entre 0.4 N/m e 2 N/m. Para análise das propriedades nanomecânicas das amostras houve a calibração completa do cantilêver. Para diminuir danos e ruídos, as imagens foram adquiridas utilizando uma frequência de varredura da ordem de 1 Hz, com resolução de 512 X 512 pixels. Para auxiliar nas análises, a matriz de dados que gera as imagens planificadas, foi transformada em uma visualização tridimensional, possibilitando um maior discernimento dos dados obtidos pela AFM (Microscopia de força atômica) (De souza & Rocha, 2011).

5. RESULTADOS

Para o entendimento do processo de invasão do parasito, realizamos interações com células hospedeiras por diferentes tempos, tais como 5, 10, 15, 30 minutos. Em 15 minutos após a sincronização dos eventos da entrada (Figura 10 A, B e C), foi possível observar por meio das diversas modalidades de microscopias empregadas, o processo de entrada dos taquizoítas nas células hospedeiras eram mais evidentes se comparados com outros tempos, bem como com a não sincronização dos eventos. Imagens de adesão inicial (Figura 10 B), das diferentes fases do processo de entrada com formação da junção móvel, e formação do vacúolo parasitoforo (Figura 10 A).



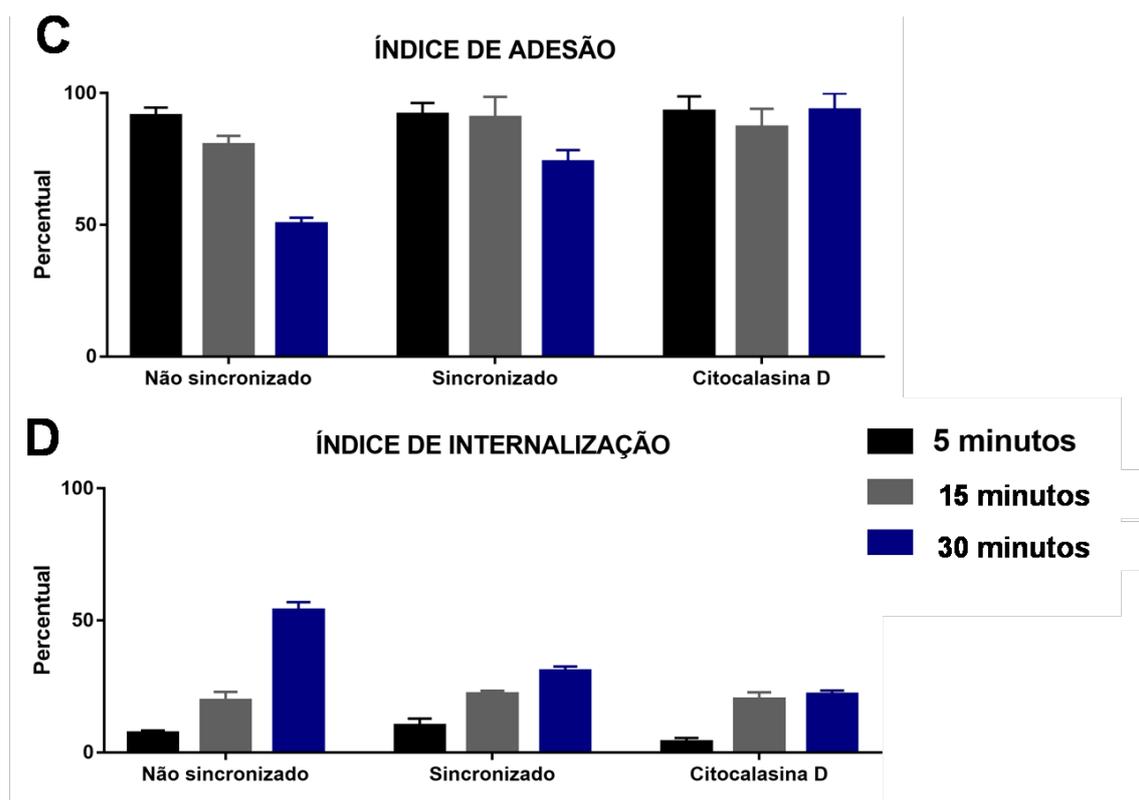


Figura 10. Análise do processo de interação do *T. gondii* com células LLCMK2 por microscopia óptica. Após os diferentes tempos de interação (5, 15 e 30 minutos) do parasito com a célula de forma não sincronizada, sincronizada ou após pré-tratamento das células hospedeiras com citocalasina D, as amostras foram processadas e coradas com Giemsa e analisadas por microscopia óptica. (A) seta mostrando o parasito já internalizado com o estabelecimento do vacúolo parasitóforo (B) mostrando o taquizoito aderido à célula hospedeira (Ponta de seta). Barras em 10 μ m. (C) Índices de adesão e (D) índices de internalização (vermelho) do *T. gondii* em interação com células LLC-MK₂ após os diferentes tempos de interação e pré-tratamento.

Microscopia óptica de fluorescência

Proteínas são secretadas durante a invasão e são importantes para parasito, que estabiliza a junção móvel durante a penetração ativa. Para visualizar o processo de invasão, foi utilizada a microscopia de fluorescência para marcação e identificação das proteínas AMA1 e RON4 no evento de entrada do *T. gondii*, conforme mostrado nas Figuras 11, 12, 13 e 14.

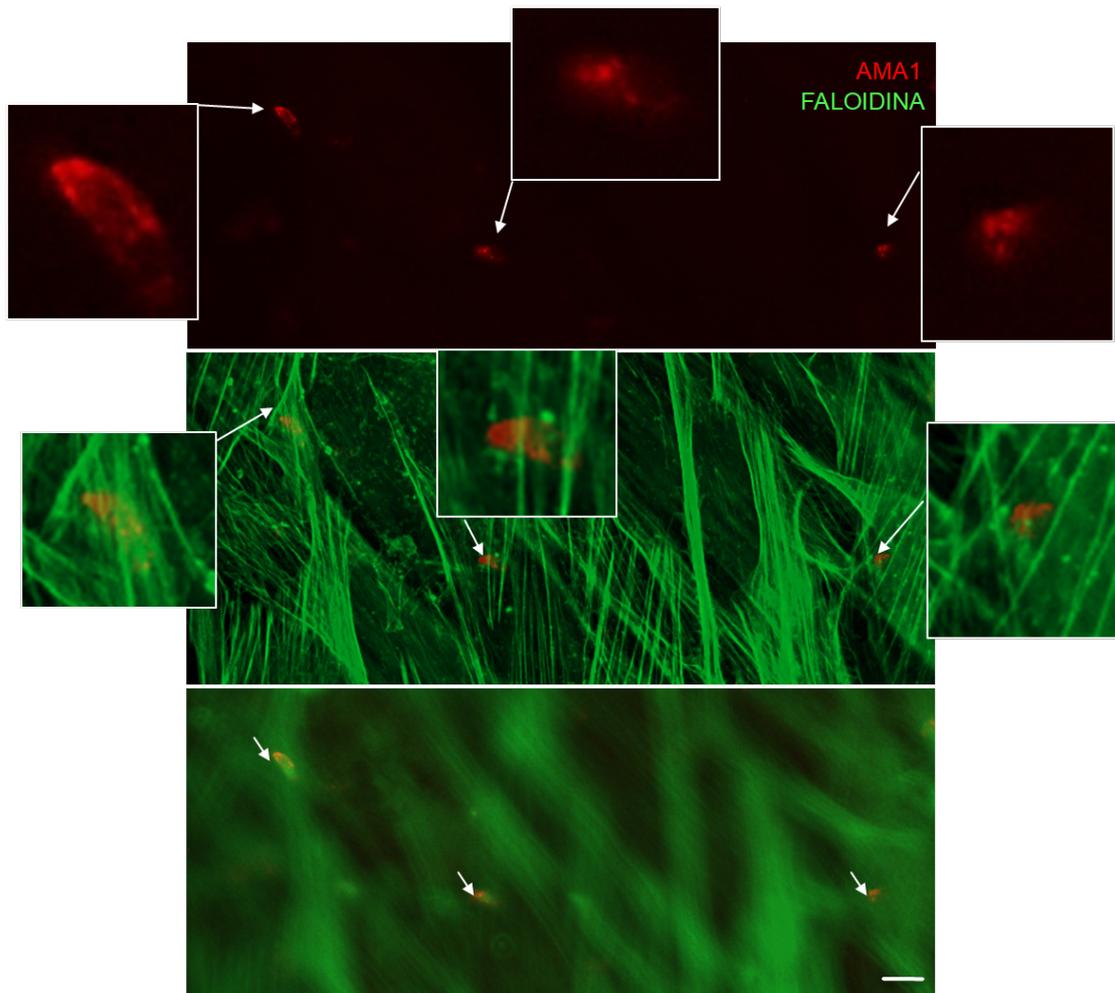


Figura 11. Células da linhagem HFF interagindo do *T. gondii* por 15 minutos. O anticorpo AMA1 marca a junção móvel no parasito, permeabilizado com saponina a 0,05% e os filamentos de actina do citoesqueleto das células hospedeiras marcadas com faloidina em verde. Análise de imunofluorescência de proteína taquizoítos no processo de associação em uma possível entrada e formação da junção móvel. 5 μ m

A estrutura da actina é normalmente vista juntamente com pontos de marcação anti-AMA1, sinalizadas em setas (Figura 13). Também é claramente visível na extremidade apical do taquizoito marcação para AMA1 no momento da sua internalização pela célula hospedeira (Figura 12). É possível observar em todos os eventos de entrada mostrados nas imagens de fluorescência, a presença dos filamentos de actina das células hospedeiras, possivelmente envolvidos nesse processo de entrada. O experimento mostra uma evidente marcação com a utilização principalmente de anti-AMA1 no ponto apical do

parasito, e uma discreta marcação para proteína AMA1 (Figura 12) na parte anterior do taquizoito.

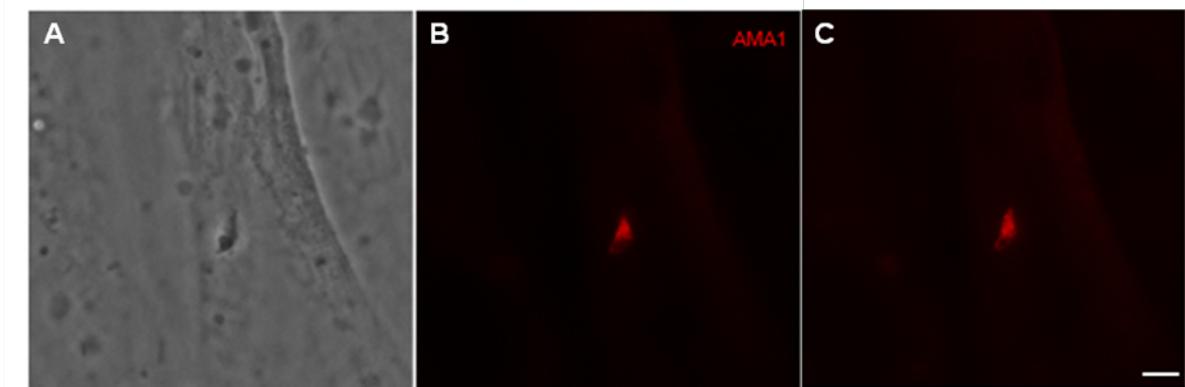


Figura 12: Marcação anti-AMA1 do parasito interagindo com células da linhagem HFF após 15 minutos. (A) O contraste de fase mostra o processo de internalização do *T. gondii* . (B) e (C) Imagens de fluorescência mostrando marcação anti-AMA1 (vermelho) mostram que o anticorpo anti AMA1 marca a região do pólo apical nos eventos iniciais da interação, aqui mostrados em dois planos distintos (setas). Barra 5 μ m

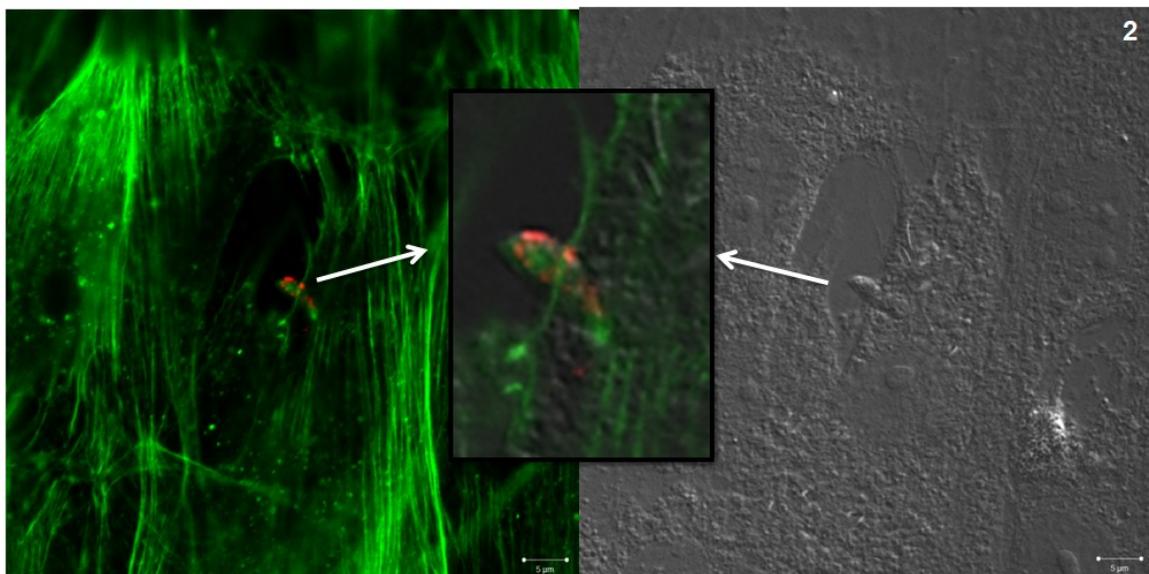


Figura 13: Células da linhagem HFF interagindo com o parasito, fixados após 15 minutos, marcação em verde nos filamentos de actina do citoesqueleto das células hospedeiras e AMA1 secretados pelo parasito em vermelho . O contraste de fase e IFA do processo de invasão do *T. gondii*

mostram que o anticorpo AMA1 marca a junção móvel no parasito. Filamentos de actina do citoesqueleto das células hospedeiras marcadas com faloidina em verde, AMA1 marcado em vermelho (em destaque; setas), disposto no corpo do taquizoíta. As setas indicam em maior aumento, a região de direção do movimento de entrada e próximo ao pólo apical uma evidente marcação dos filamentos de actina da célula hospedeira.

Os experimentos de IFA indicam que o conteúdo micronemal (AMA1) foi secretado do ponto mais apical (Figura 12), presente na junção móvel, porém há um ponto de marcação muito específica de anti-RON4, o que sugerimos ser a secreção dessa proteína durante a entrada do taquizoito (Figura 14). Mesmo sendo secretados por organelas próximas a interação com a célula hospedeira (Figura 13 e 14) observamos marcação de ambas as proteínas (AMA1 e RON4) durante a formação da junção móvel, provavelmente em estruturas distintas, sugerindo o envolvimento destas proteínas na internalização nas células hospedeiras.

Nos eventos da entrada analisados, no ponto de contato entre o parasito e a membrana da célula hospedeira, é indicativo da região de origem da estrutura da junção móvel (Figura 14). Esta junção é composta por proteínas como a RON4, proveniente das róptrias, e também AMA1, oriunda dos micronemas

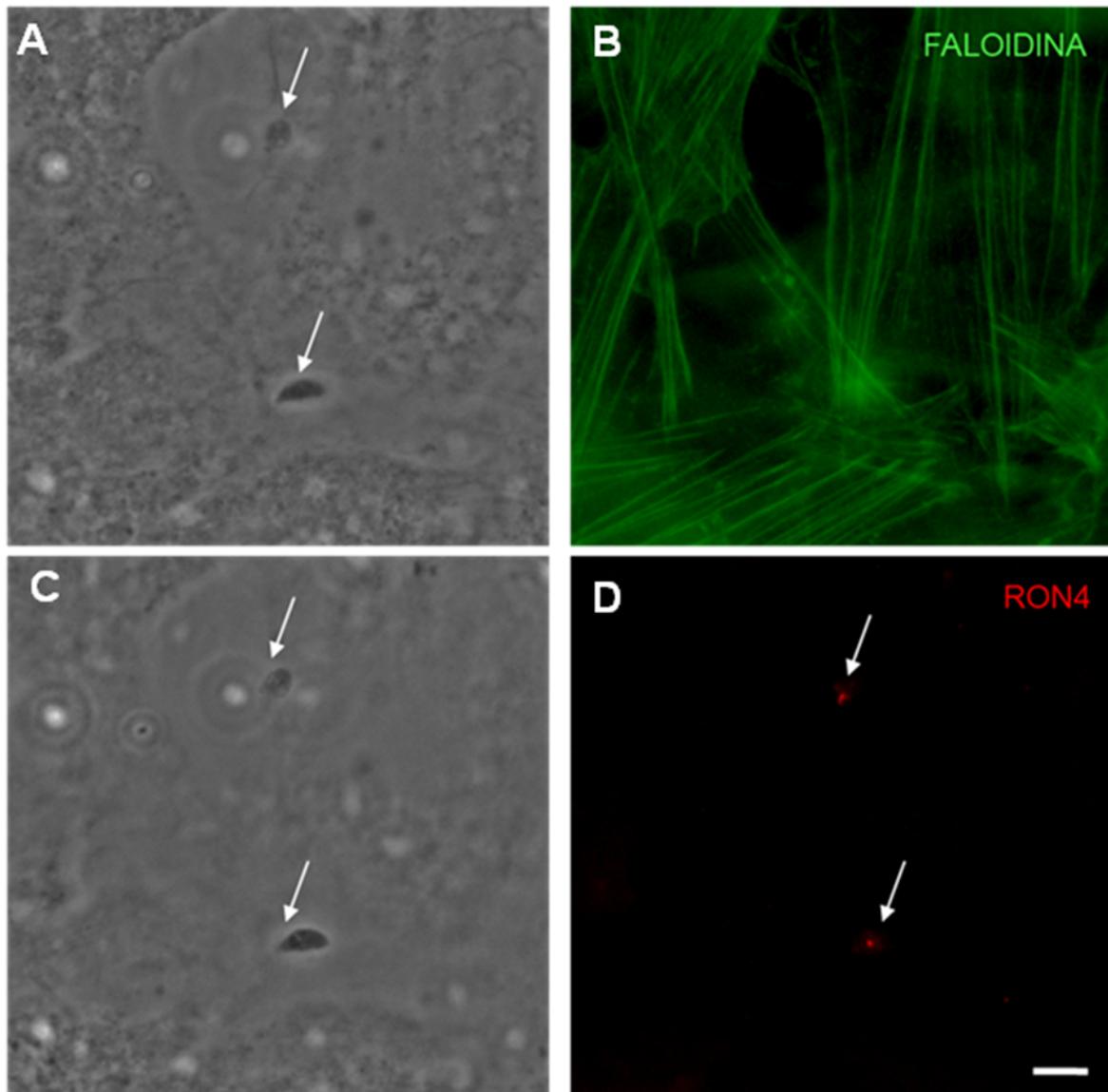


Figura 14: Parasito interagindo com células da linhagem HFF, marcação anti-RON4 e actina da célula hospedeira. O contraste de fase (A e C) e IFA (B e D) do processo de invasão do *T. gondii* mostram que o anticorpo anti-RON4 (vermelho) marca o polo apical do taquizoíto o que é sugestivo da secreção da proteína RON4 durante a formação junção móvel. Células permeabilizadas com saponina a 0,05% marcando os filamentos de actina do citoesqueleto das células hospedeiras marcadas com faloidina (em verde) 5 μm .

Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para analisar os eventos iniciais da interação. Os estudos foram realizados com a linhagem de células epiteliais LLCMK₂, e indicam que os eventos iniciais da adesão (Figura 15 e 16) e internalização dos taquizoítas (Figura 17) contam com a participação da célula hospedeira, que reage com a formação de projeções de membranas do tipo lamelopódios e filopódios (Figura 18). Uma intensa vesiculação foi observada na região de entrada do taquizoíto nas células hospedeiras (Figura 24) nunca descrito antes.

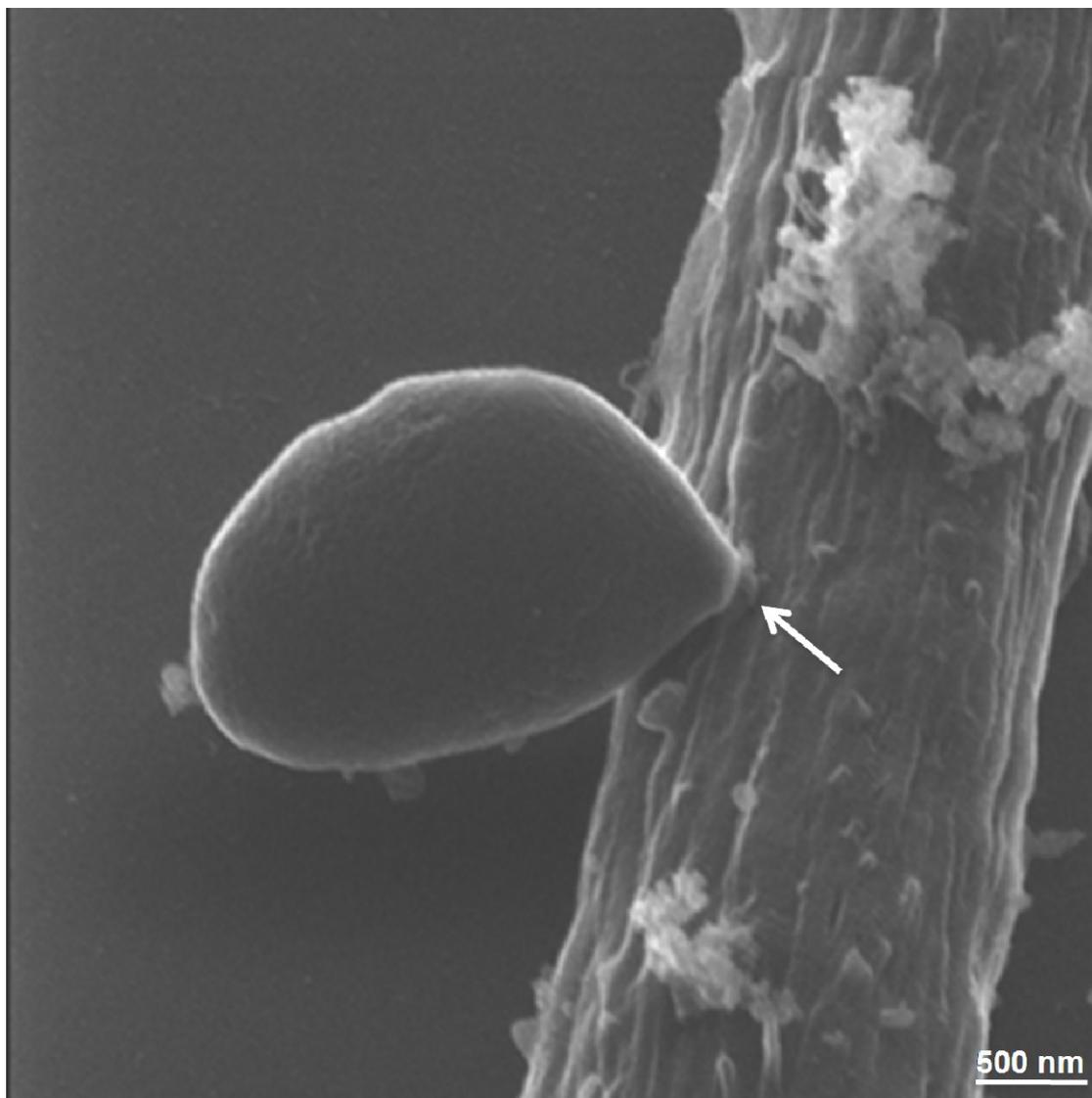


Figura 15. Aspecto morfológico do contato do taquizoíto em células hospedeiras por microscopia de íons. Início da invasão da célula hospedeira em 15 minutos de interação por microscopia de íons. É possível

observar a porção apical (seta) em contato direto com a célula hospedeira, durante a primeira fase do processo invasivo.

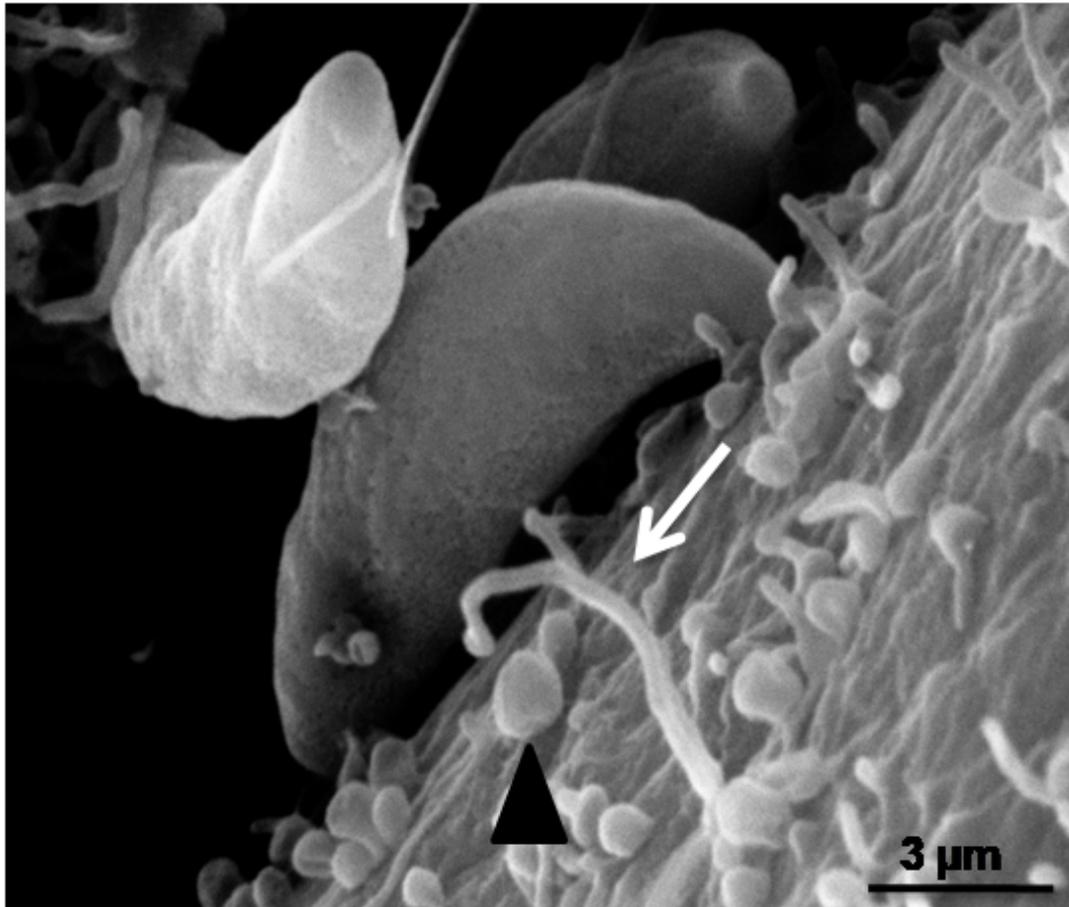


Figura 16. Superfície da célula hospedeira em contato com o taquizoíto. Na região de contato com o parasito, a superfície da célula hospedeira apresenta estruturas de vesículas (ponta de seta) e projeções de membrana (seta) em 15 minutos de interação.

Ainda durante os eventos iniciais, logo após o contato do parasito na superfície, observou-se o que pode caracterizar o início da internalização do *T. gondii* na célula hospedeira (Figura 17), pois não se observa a parte apical do parasito, enquanto são notadas projeções da célula hospedeira (Figuras 16, 17, 18 e 19).

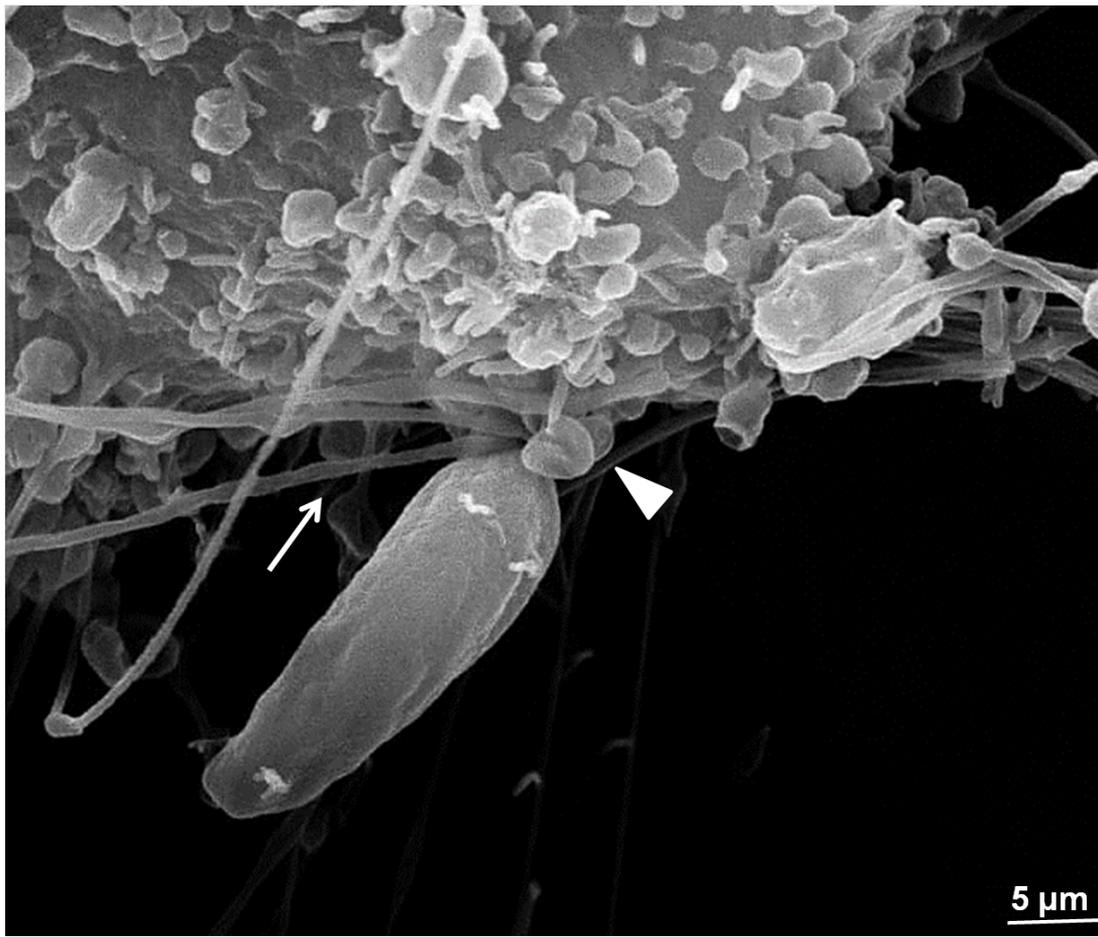


Figura 17. Processo de entrada, sequencial a adesão do taquizoíto nas células hospedeiras. Após 15 minutos de interação, é possível observar próximo da região do contato apical do taquizoíto com a célula hospedeira é possível observar na superfície vesículas (cabeça de seta) e filamentos (seta), envolvidos nesse processo.

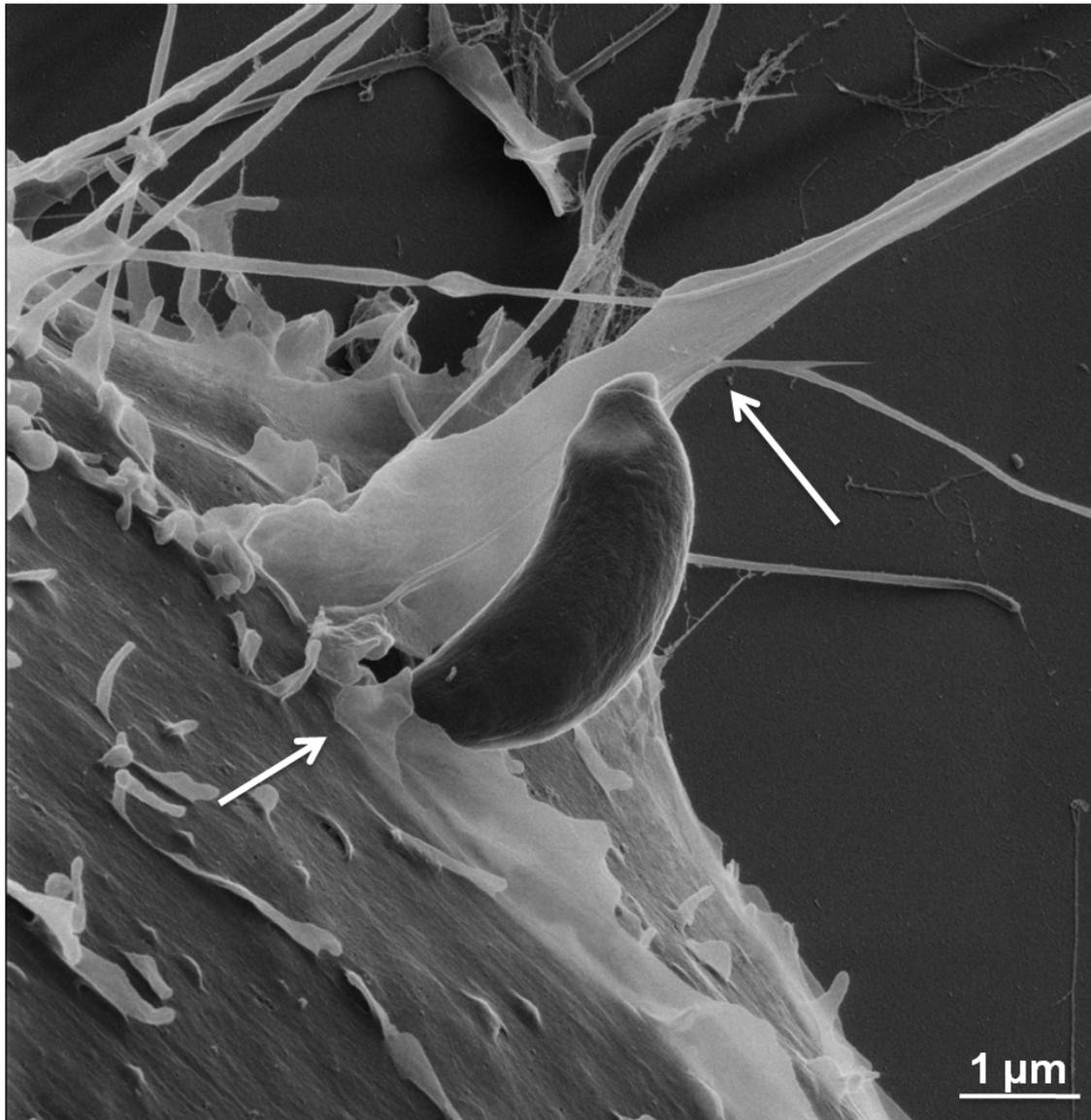


Figura 18. Projeções de membrana envolvendo o taquizoíto no evento da entrada, por microscopia de íons. Após 15 minutos de interação, nota-se o parasito entre as projeções (seta) da célula hospedeira similares a lamelopódeos, que parecem envolvê-lo durante a entrada.

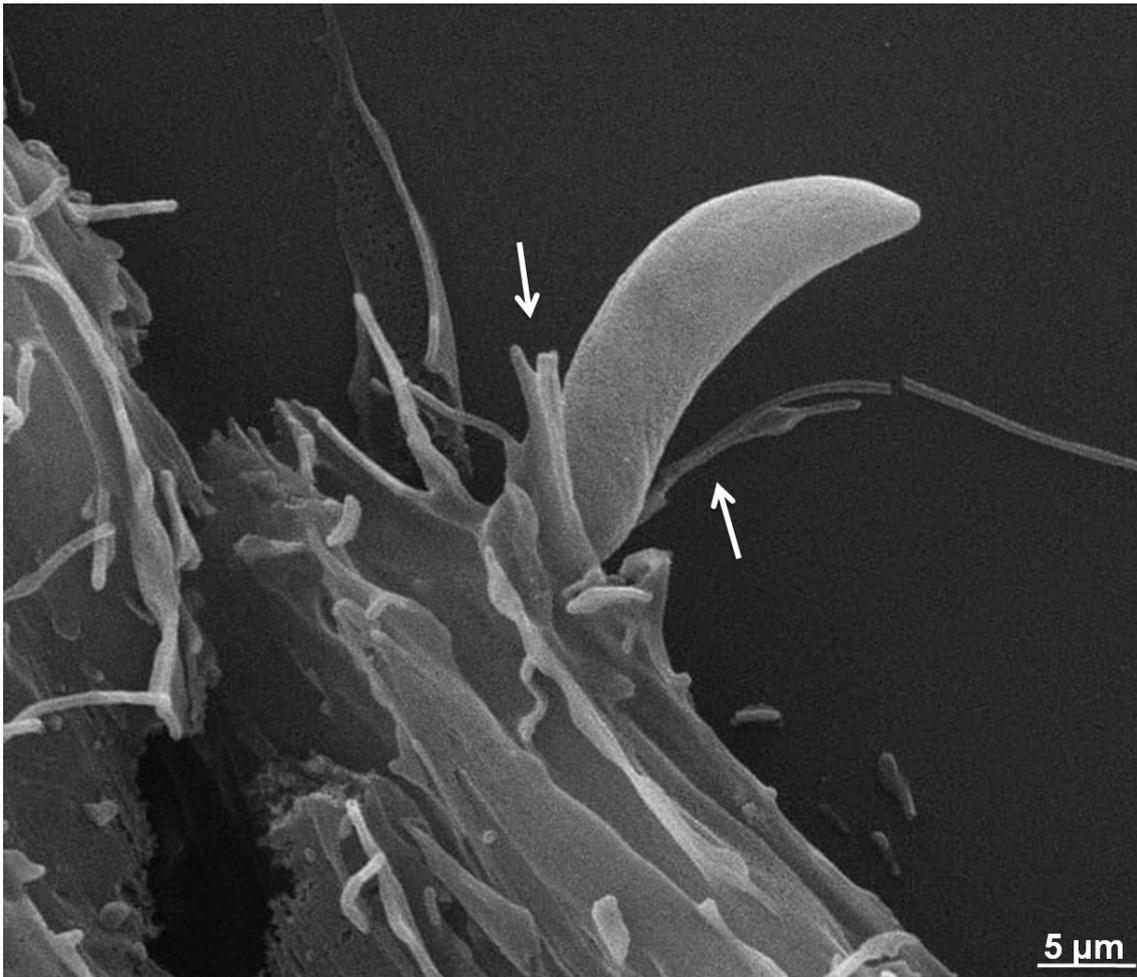


Figura 19. Aspectos morfológicos das células hospedeiras em contato com o *T. gondii*. Notam-se projeções citoplasmáticas da célula hospedeira envolvendo a parte posterior do parasito (setas), bem como uma torção no corpo do taquizoita.

Encontramos um aumento distinto nessa região como projeções que variavam de 3 a 7nm de diâmetro partindo da célula hospedeira, envolvendo o taquizoito, onde não há contato direto do parasito com a célula hospedeira (Figura 20 e 21) em comparação com a região observados nas figuras 17, 18 e 19, que ocorreu o processo inicial de contato e reconhecimento. Complementar a essa associação, foram observadas projeções como filopódios e lamelipódios (Figura 18). As projeções de membrana eram mais evidentes na região de contato do parasito com a célula hospedeira indicativos do envolvimento de estruturas superficiais e dos domínios citoplasmáticos associados ao citoesqueleto da célula hospedeira

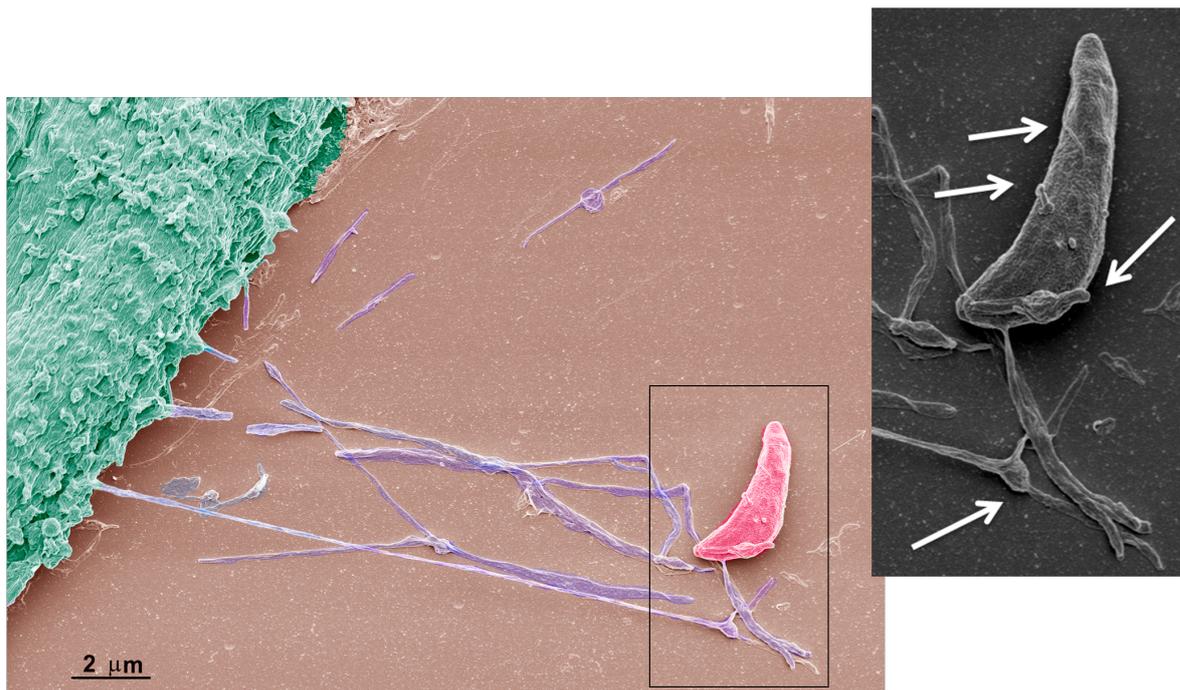


Figura 20. Projeções finas, provavelmente nanotubos de tunelamento, envolvendo o tachizoito. Micrografia evidenciando um evento de reconhecimento através das projeções (setas) emitidas pela célula hospedeira e fazendo contato com um tachizoísta de forma a envolvê-los.

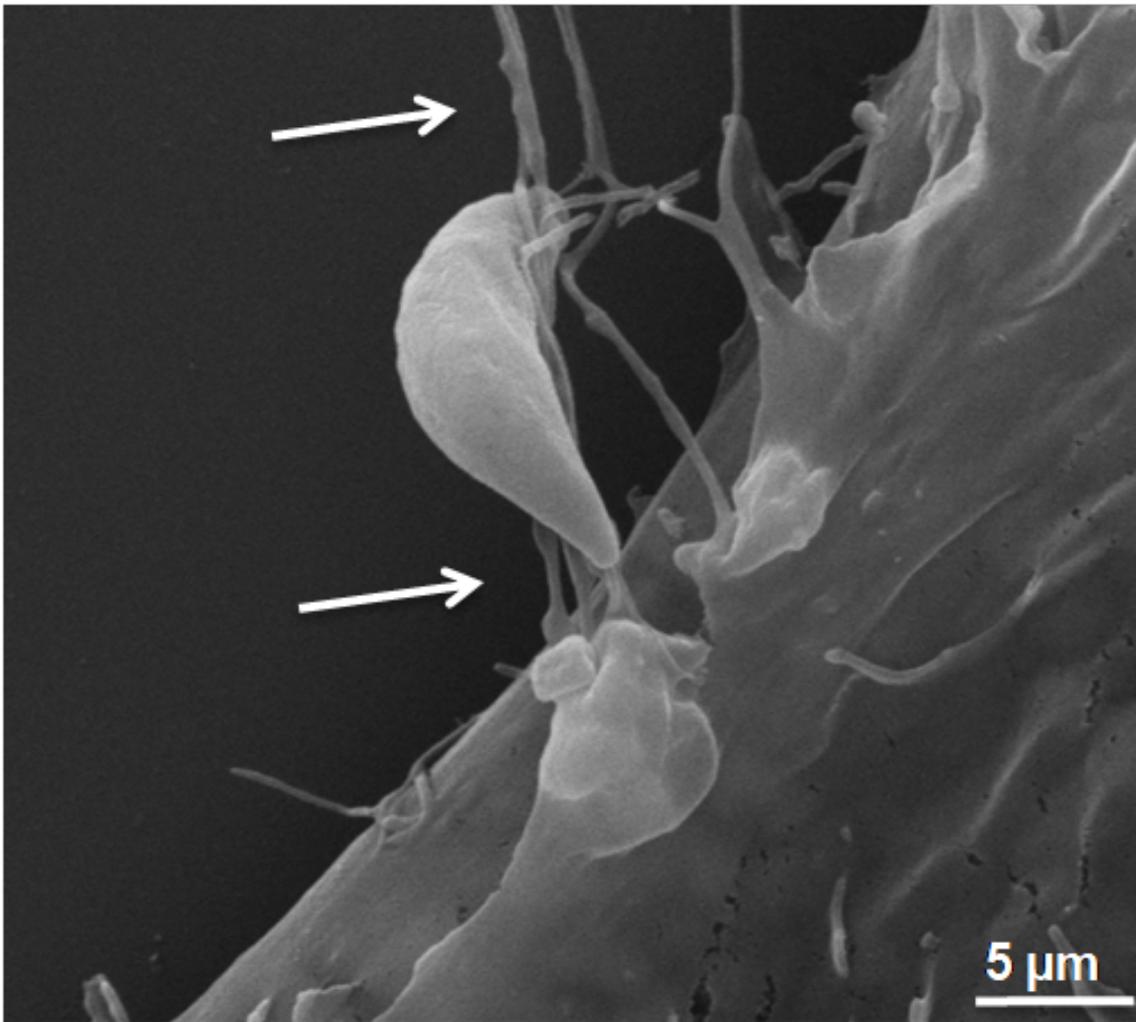


Figura 21. Nanotubos de tunelamento das células hospedeiras e o taquizoito durante o reconhecimento. O taquizoito estava envolvido nesses filamentos (seta) projetados da superfície da célula hospedeira.

Além das projeções já citadas, outro padrão observado em nossos resultados, é de que nas regiões onde há a presença do taquizoíto, é intensa a presença de vesículas (Figuras 22, 23 e 24).

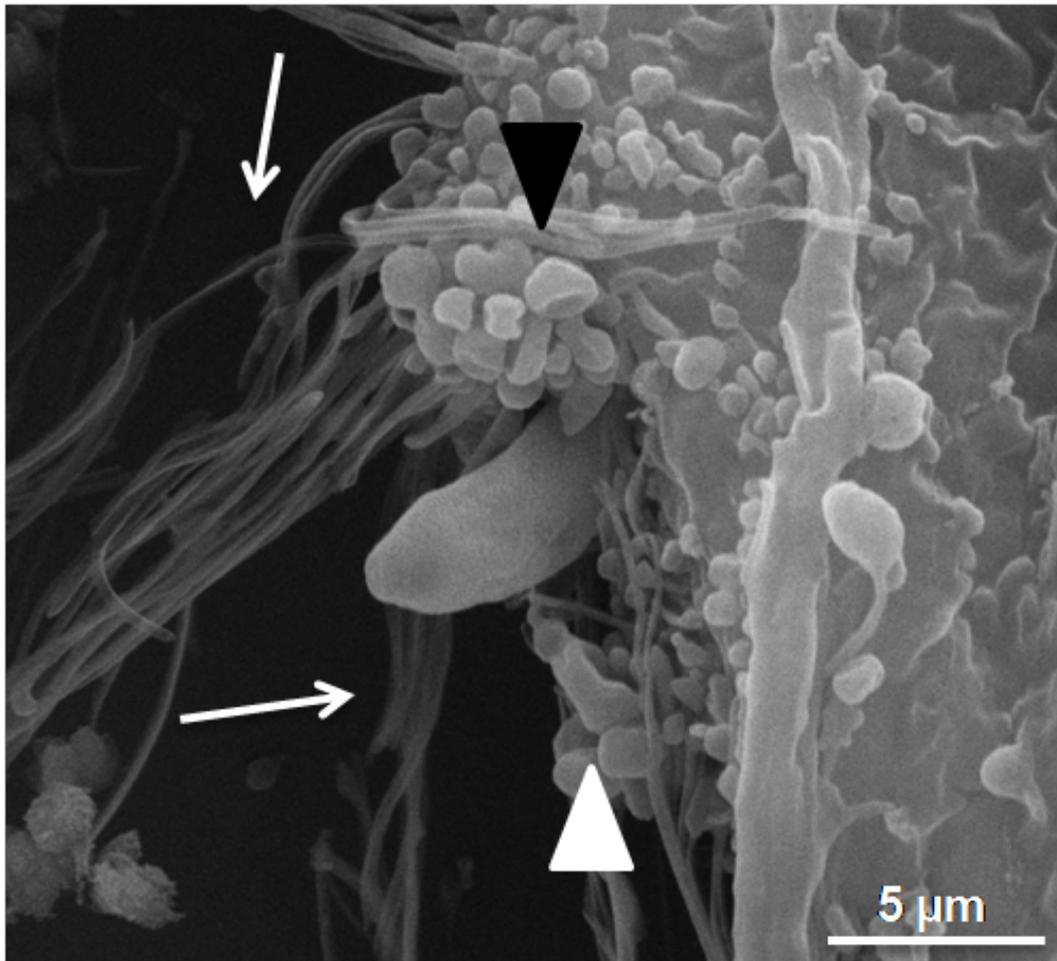


Figura 22. Aspectos da interação entre o parasito e a célula hospedeira. Longos projeções do tipo nanotubos (seta) partindo da célula hospedeira próximo à região de contato com o taquizoíta. Nessa região também podem ser observadas vesículas (ponta de seta) na membrana da célula hospedeira.

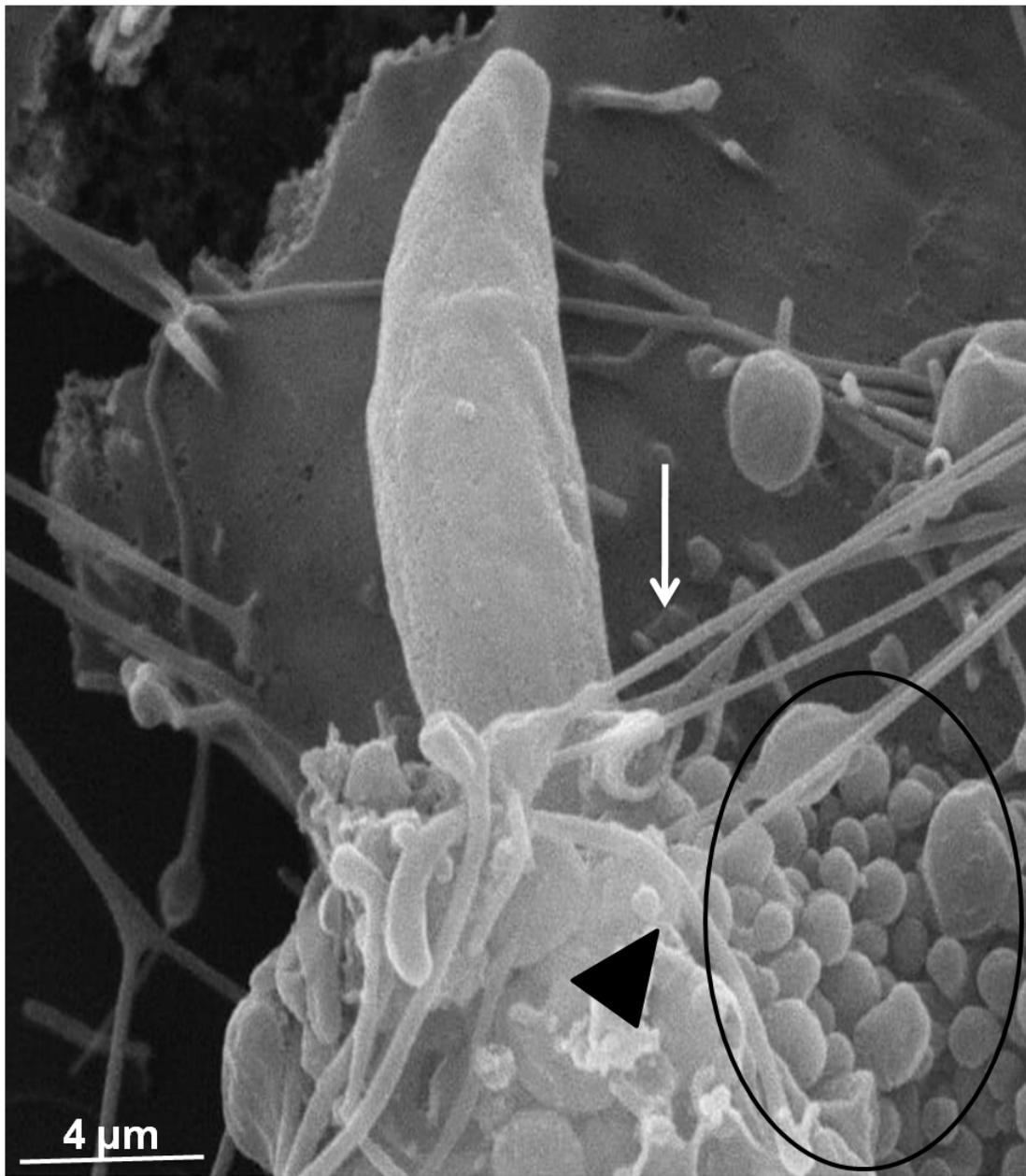


Figura 23. Morfologia da região de contato do taquizoíto com a célula hospedeira. Na região de contato é possível observar nanotubos (seta), juntamente a vesículas na superfície da célula hospedeira (ponta de seta).

Foi possível também investigar a estrutura da superfície da célula hospedeira e o parasito, durante a adesão e formação da JM. Além das vesiculações que parecem ter sido secretados pela célula hospedeira, a figura 24, sugere um outro padrão de vesiculação, que sugerimos ser secretado pelo parasito.

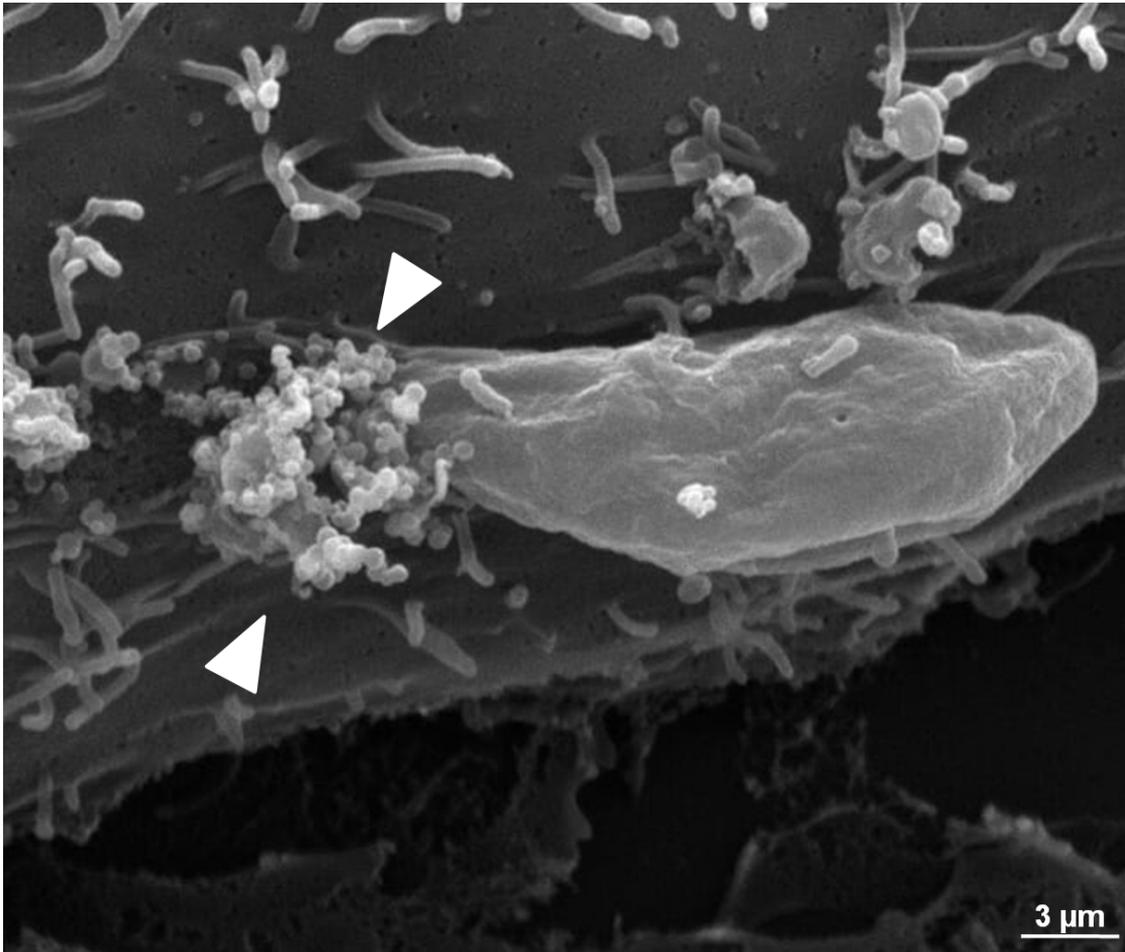


Figura 24. Vesiculação durante a interação de taquizoito com a célula hospedeira. Inúmeras vesículas (ponta de seta) são observadas nessa região de entrada do taquizoíta na célula hospedeira.

Para uma análise da influência da célula hospedeira no processo de entrada do parasito, especificamente na região de adesão do parasito, as células hospedeiras foram previamente à interação com o *T. gondii*, incubadas na presença de citocalasina D, um agente que inibe a polimerização da actina. Após tratamento com citocalasina D, foi possível observar a visualização de vesículas na região próxima ao conoide do taquizoíto (Figura 25), vesículas que parecem ter sido secretadas durante seu processo de invasão, indicando

uma participação da célula hospedeira na internalização do parasito e uma redução significativa da entrada se comparada ao ensaio sem tratamento.

As dimensões das vesículas encontradas na região apical do *T. gondii* em contato com a superfície da membrana da célula hospedeira tratadas com citocalasina D foram mensuradas. Foi possível observar vesículas de diferentes tamanhos, variando entre 50nm (15%) e 100nm (30%) de diâmetro, sendo que a maioria dessas vesículas apresentaram um diâmetro de cerca de 80nm (55%) nanômetros conforme mostrado na Figura 26

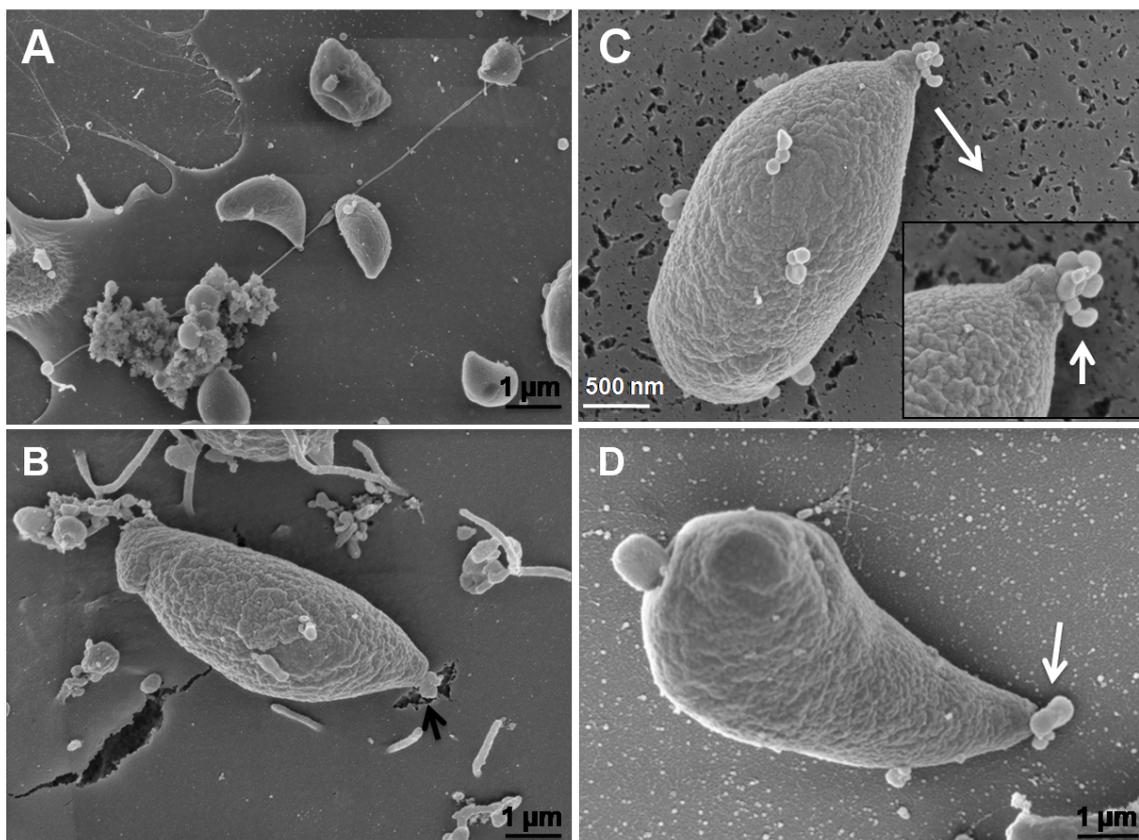


Figura 25. Células da linhagem LLC MK2 tratadas com citocalasina D por 15 minutos e que em seguida interagiram com *T. gondii* por 15 minutos após serem submetidos à sincronização de entrada. (A) Micrografia mostrando parasitos aderidos após tratamento prévio da célula hospedeira, (B) observa-se padrões de adesão nessa região de contato (seta), (C) possível observar vesículas (seta) no conoide do taquizoíto durante a invasão com aspecto encadeado (D) e algumas vesículas também presentes do conóide (seta).

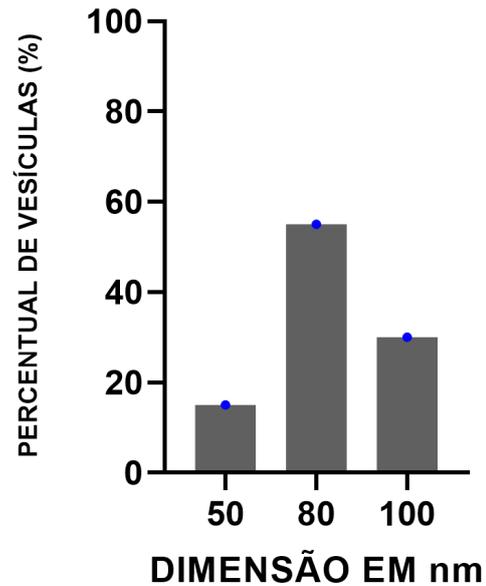


FIGURA 26. Gráfico com as dimensões das vesículas encontradas na região apical do *T. gondii* por MEV tratadas com citocalasina D.

Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para analisar os eventos iniciais da interação (Figura 27) e formação da junção móvel na internalização do parasito. Na região onde se formou a junção móvel (Figura 28 e 29), há uma constrição visível ao redor do parasito. Durante esse processo, se inicia o surgimento de uma membrana para o vacúolo parasitóforo (VP) nascente. Também são evidentes as microvilosidades provenientes da célula hospedeira, formando projeções que envolvem o parasito (Figuras 28).

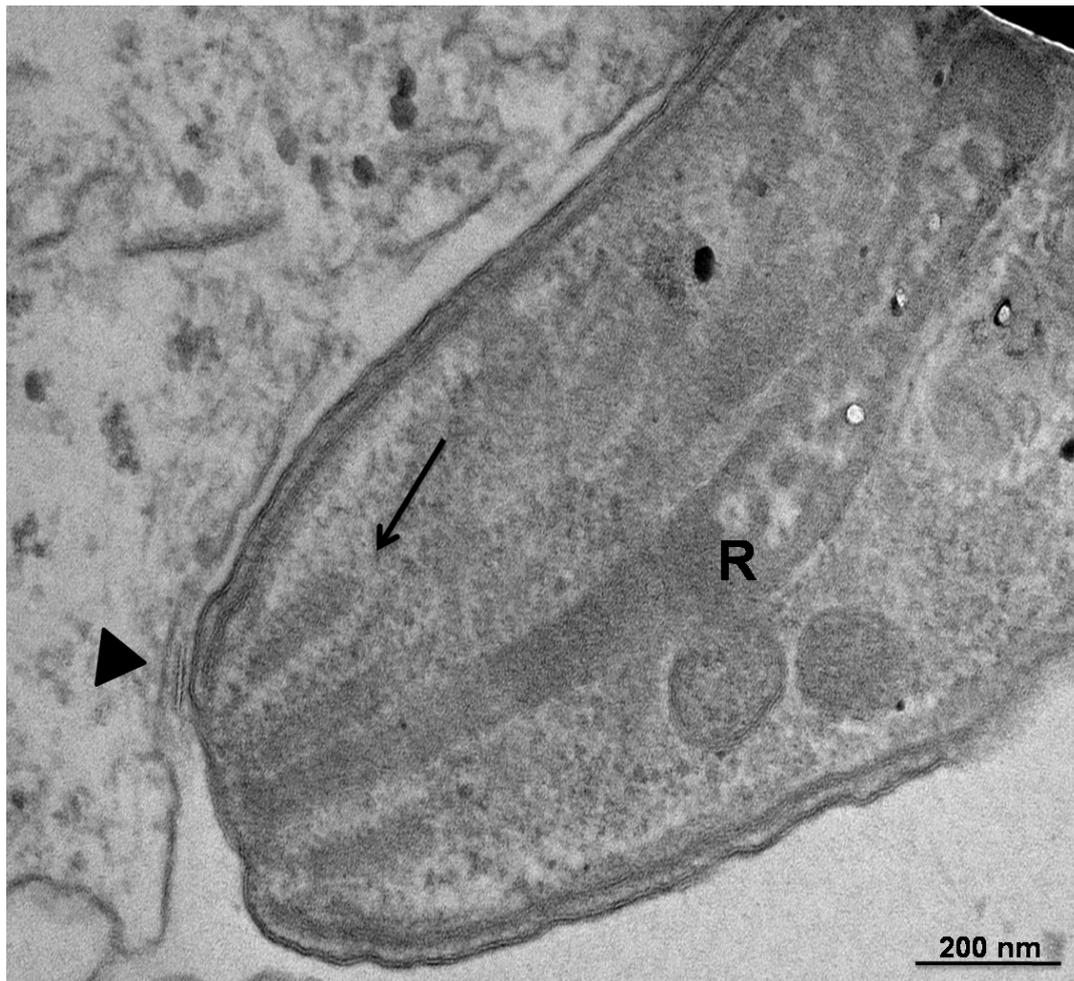


Figura 27: *T. gondii* interagindo com células da linhagem LLC MK2 após sincronização dos eventos de entrada. Micrografia da região de contato entre o taquizóito e a célula hospedeira, observando em seta um micronema, possível observar também toda a extensão da róptria (R) se estendendo desde a porção anterior até a extremidade apical do parasito, onde na extremidade anterior observa-se um aspecto esponjoso vazio.

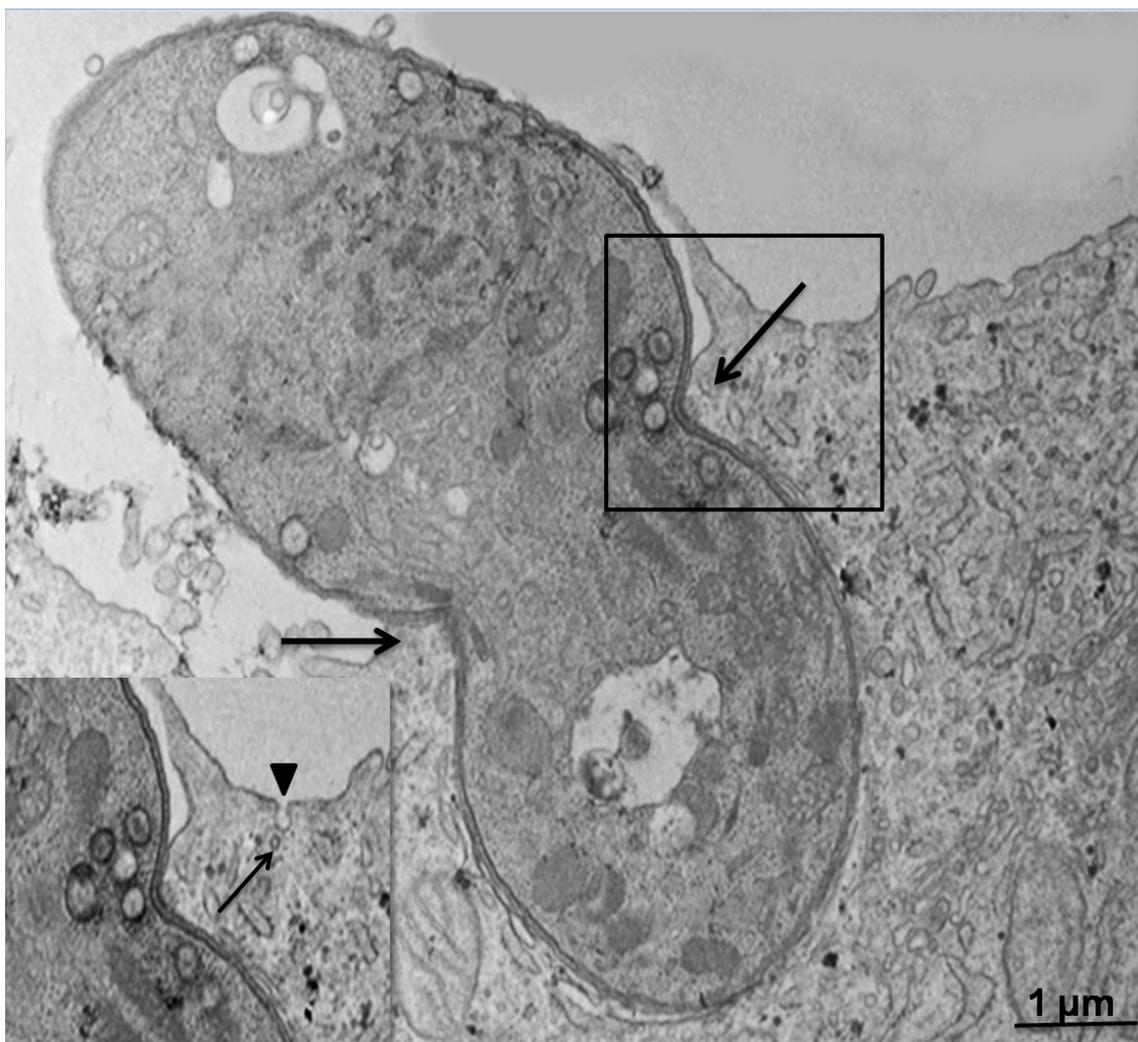


Figura 28: Junção móvel após sincronização de entrada do *T. gondii*. Taquizoíto com parte do corpo celular internalizado, evidente o estreitamento do corpo no ponto de passagem pela junção móvel (setas). Em destaque na região de entrada do parasito (canto inferior esquerdo), observa-se região de endocitose (ponta de seta) e presença de microtúbulo (seta).

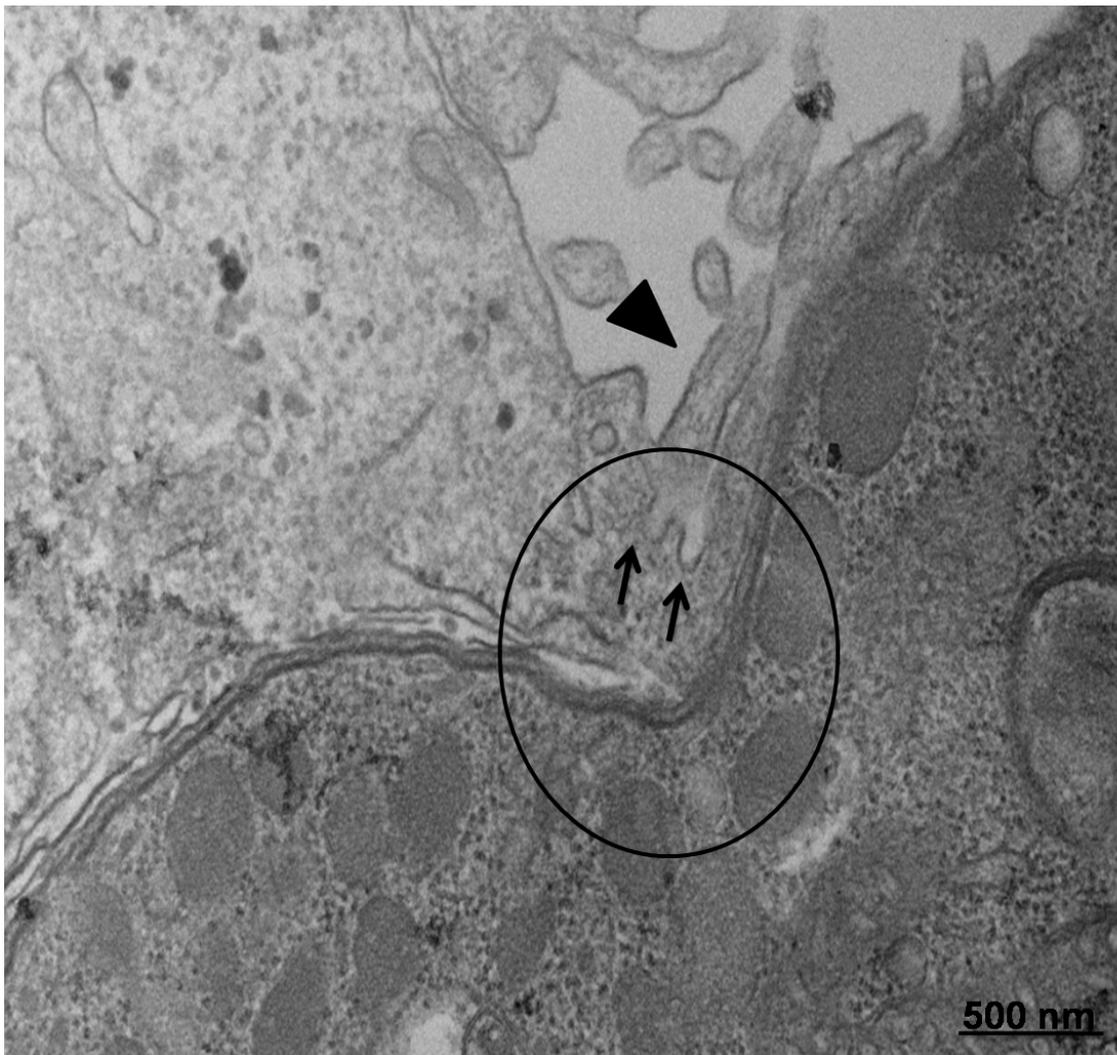


Figura 29: Indicativo de endocitose da célula hospedeira próximo a junção móvel após sincronização dos eventos de entrada. Micrografia de menor aumento mostrando a região da junção móvel (círculo), além de invaginações características de processos endocíticos (setas), e projeção da membrana citoplasmática (cabeça de seta) envolvendo o taquizoíto durante a entrada. Barra = 500 nm.

Durante o processo de penetração ativa do *T. gondii*, a célula hospedeira reorganiza a distribuição de suas organelas, como fica evidente na Figura 30, onde se observa uma maior proximidade da mitocôndria, do Complexo de Golgi e principalmente do retículo endoplasmático rugoso, com a região da invasão do parasito. É possível observar que na região de internalização, há vesículas com diferentes padrões na área entre a célula hospedeira e o taquizoíto (Figura 30).

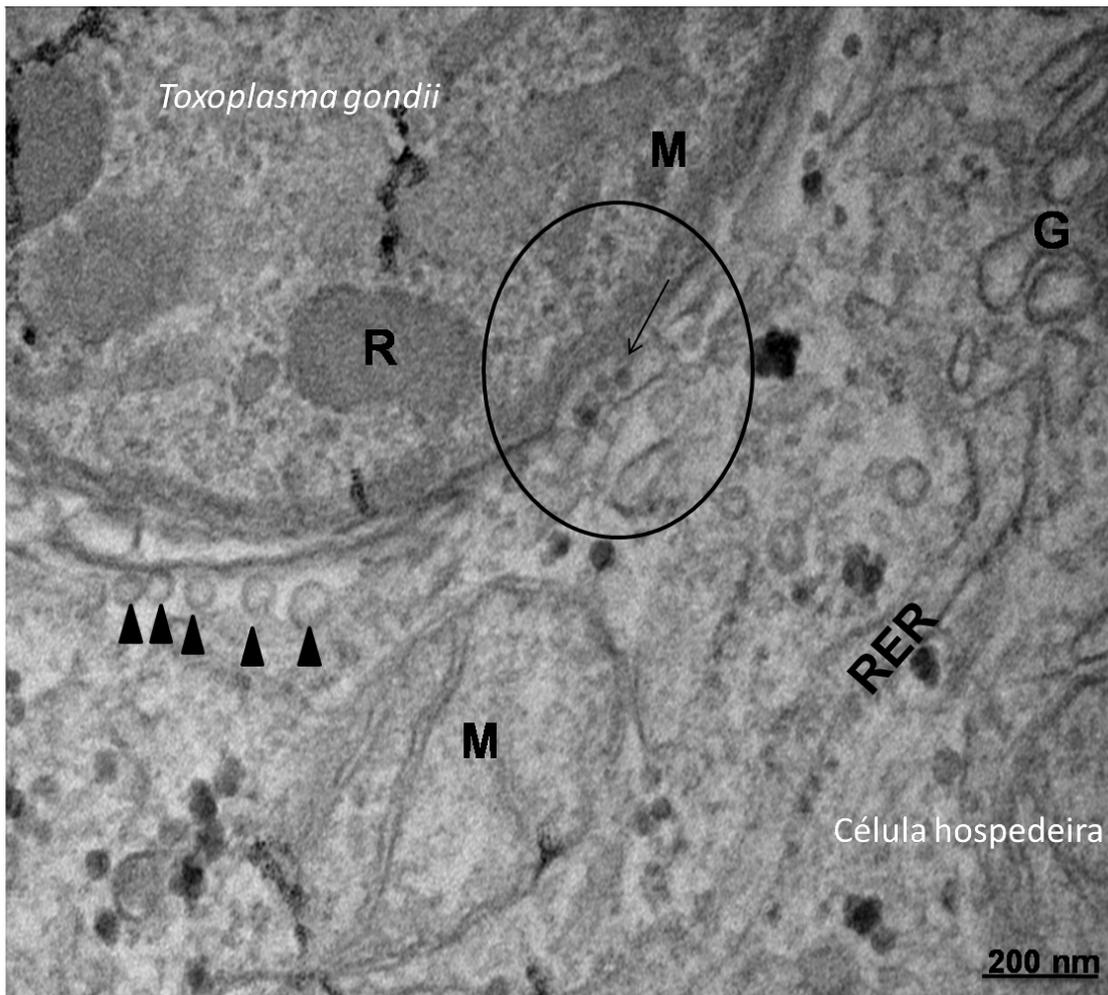


Figura 30: Vesículação durante a entrada do taquizoíta na célula hospedeira após sincronização dos eventos de entrada. Micrografia evidenciando a róptria (R), micronema (M), seta apontando vesículas de 50nm, ponta de seta indica vesículas maiores de até 100nm de diâmetro na região de entrada. E ainda é evidente a mitocôndria (M), Complexo de Golgi (G) e retículo endoplasmático rugoso (RER) da célula hospedeira.

Os micronemas estão concentrados na porção periférica do pólo apical do parasito, em torno das róptrias (Figura 31, 32). Os micronemas se apresentavam como estruturas alongadas e foram observados em grande quantidade. É possível ainda visualizar as róptrias com conteúdo em seu interior, ou até mesmo vazias, com aspecto menos eletrondenso (Figura 32). Nesse evento o parasito apresenta seu corpo em forma de “meia lua”,

podendo-se observar o conoide protruído, indicativo de secreção de proteínas durante a invasão.

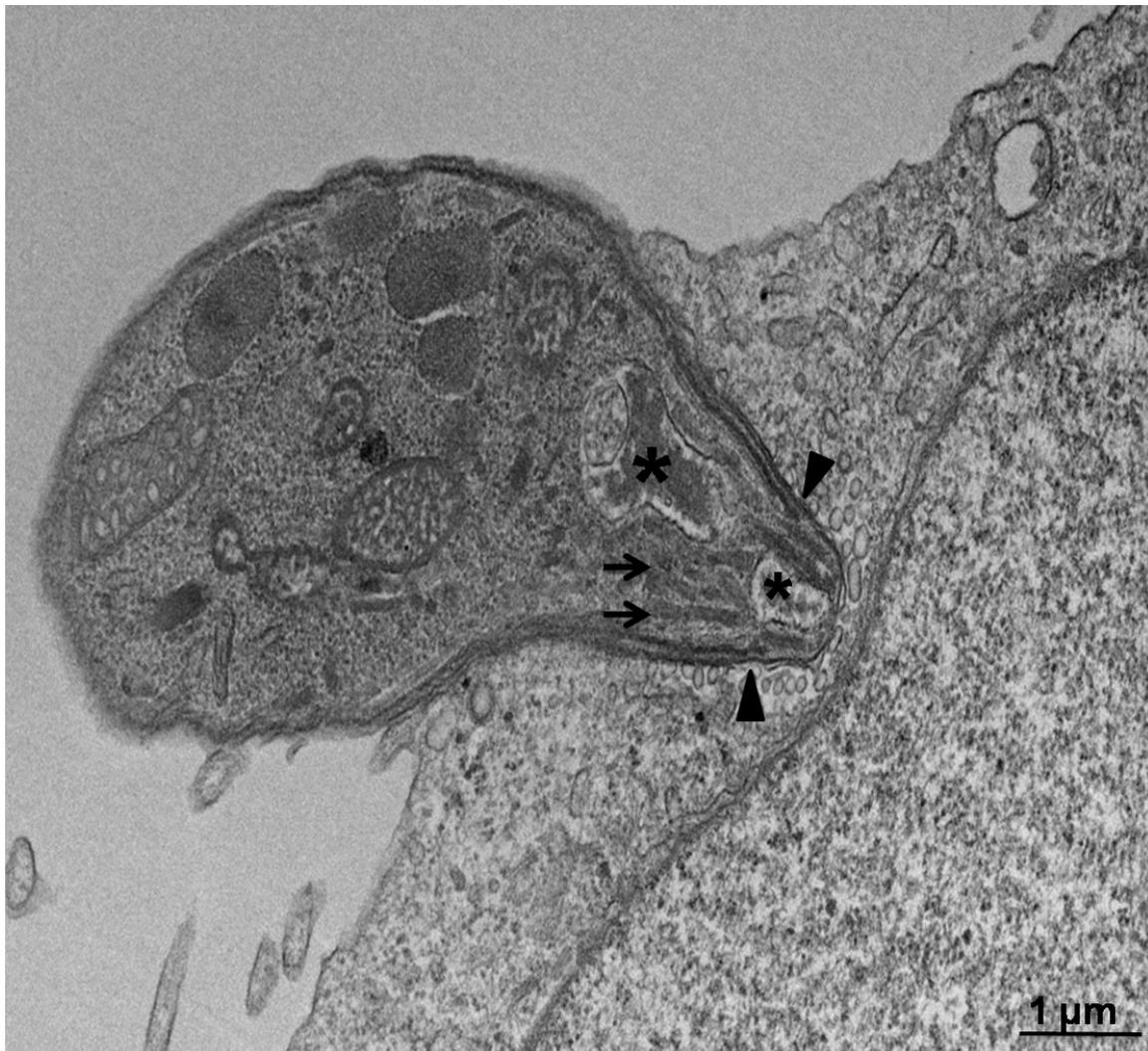


Figura 31: Morfologia da entrada do taquizóito na célula hospedeira após sincronização dos eventos de entrada. Micrografia mostra um corte longitudinal de um parasito entrando na célula hospedeira, onde é possível observar conoide protruído com vários micronemas (setas), e róprias descarregando seu conteúdo (asterisco).

Os dados morfológicos observados pela microscopia eletrônica de transmissão demonstraram a presença de vesículas na região apical do *T. gondii* (Figura 32). As medidas realizadas mostraram uma variação de diâmetro entre 80 nm (representam 30% das vesículas analisadas) e 100 nm (representam 20% das vesículas analisadas), sendo que há maior quantidade de vesículas apresentando 50 nm de diâmetro (cerca de 50% das vesículas

analisadas), conforme gráfico (Figura 33), padrão diferente do que foi observado e mensurado por microscopia eletrônica de varredura.

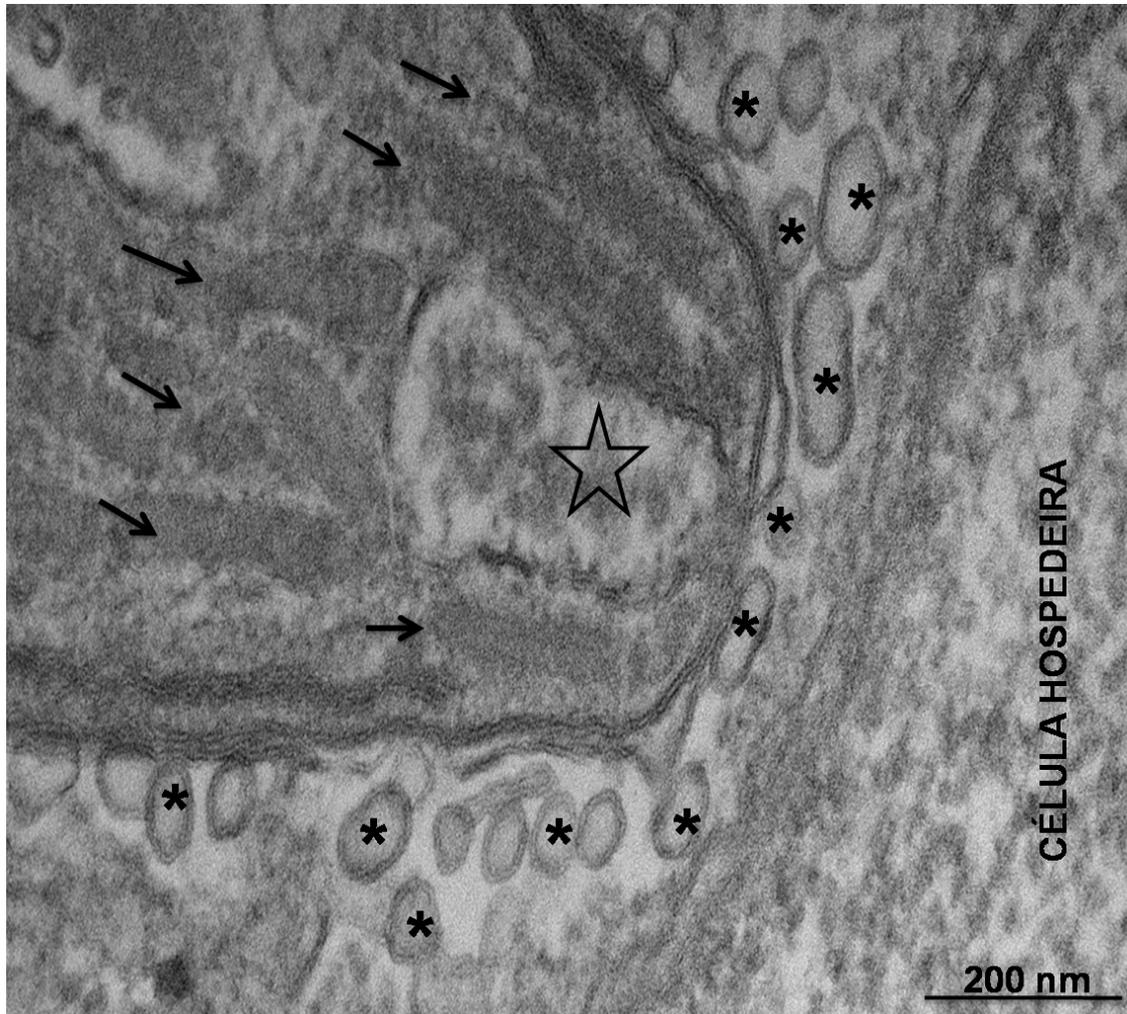


Figura 32: Morfologia das vesículas na região de entrada do taquizóito na célula hospedeira após sincronização dos eventos de entrada. Imagem do parasito com o conóide internalizado, em estrela é possível observar uma rópria com conteúdo interno, micronemas (setas) e inúmeras vesículas (asterisco) na região de contato com a célula hospedeira e próximo ao núcleo (N).

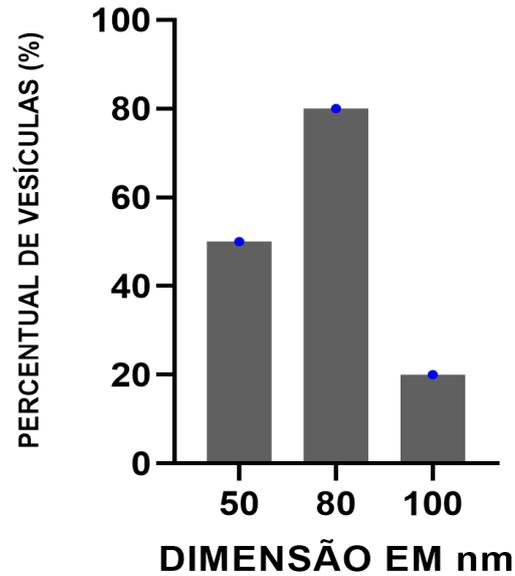


Figura 33. Gráfico das dimensões das vesículas encontradas na região apical do *T. gondii* por MET.

Marcadores das vias endocíticas das células hospedeiras

Foram usadas células da linhagem LLC MK₂ interagindo com *T. gondii* onde foi realizada marcação com a peroxidase, e após 15 minutos sincronização dos eventos de entrada, obtivemos os resultados que ainda não tinham sido descritos. Observamos marcações nas vesículas endocitadas pela célula hospedeira (Figura 34B), assim como na superfície do taquizoíta também houve marcação (Figura 34A), contudo essa marcação não se manteve nos parasitos já internalizados ou em processo de entrada (Figura 34C e D).

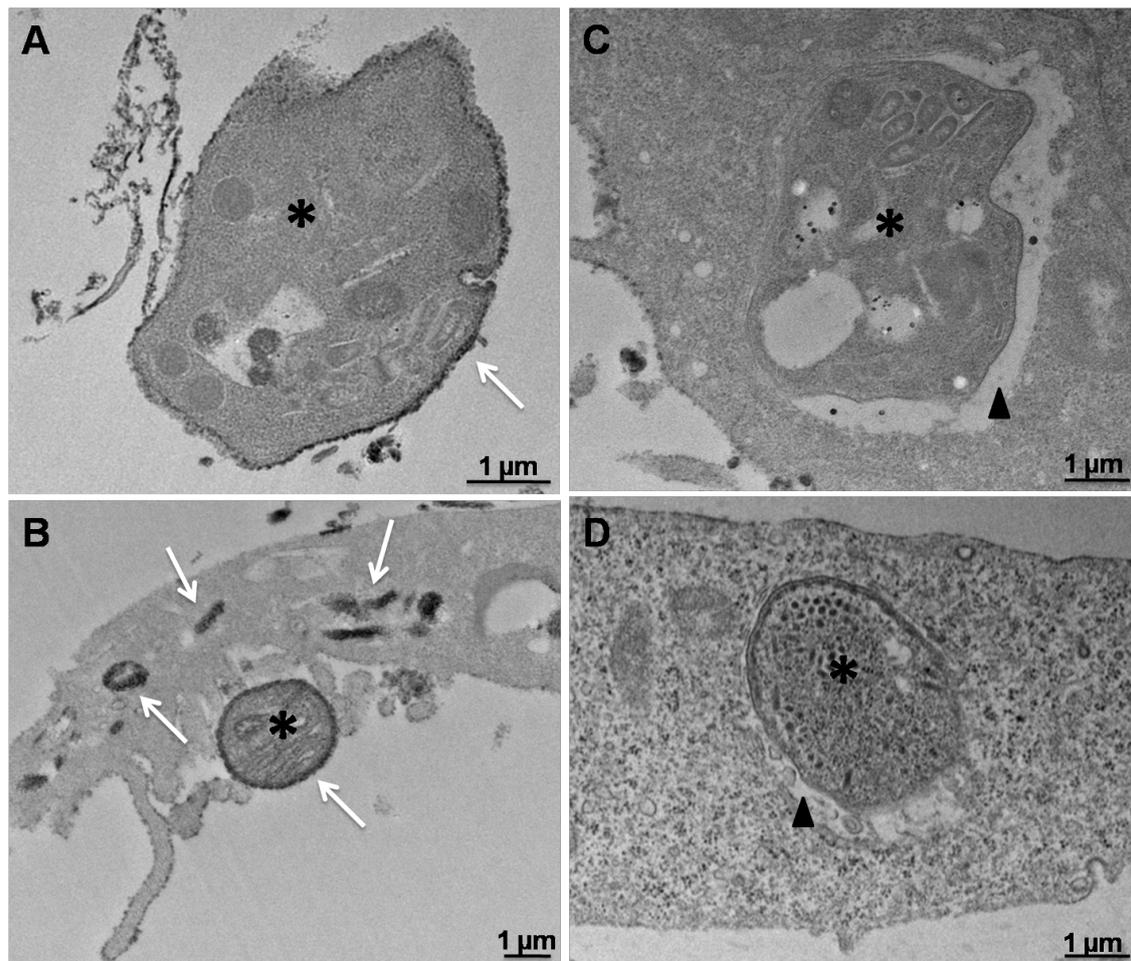


Figura 34 - Marcação com peroxidase para observação dos processos endocíticos durante a interação entre *T gondii* e células hospedeiras. Nota-se que o taquizoito quando não está em contato com a célula hospedeira apresenta marcação com peroxidase (A). Essa marcação se mantém no parasito em contato com a célula (asterisco), além de ser possível observar vesículas endocitadas pela célula hospedeira e marcadas por peroxidase distribuídas pelo citosol (setas) (B). Os taquizoitos internalizados (asterisco; C e ponta de seta; D) não apresentam a superfície marcada com a peroxidase.

Em alguns experimentos utilizamos partículas (10nm) de ouro coloidal revestidos com albumina para marcação das vias endocíticas. Na maioria das células não infectadas observamos vacúolos contendo as partículas de ouro coloidal revestidos com proteína albumina de maneira inesperada após 15 minutos de interação, também observamos marcação na superfície de taquizoitos extracelulares, inclusive na região onde se encontra o microporo.

Em algumas imagens observamos marcação em vesículas citoplasmáticas localizadas próximos ao microporo (Figura 36).

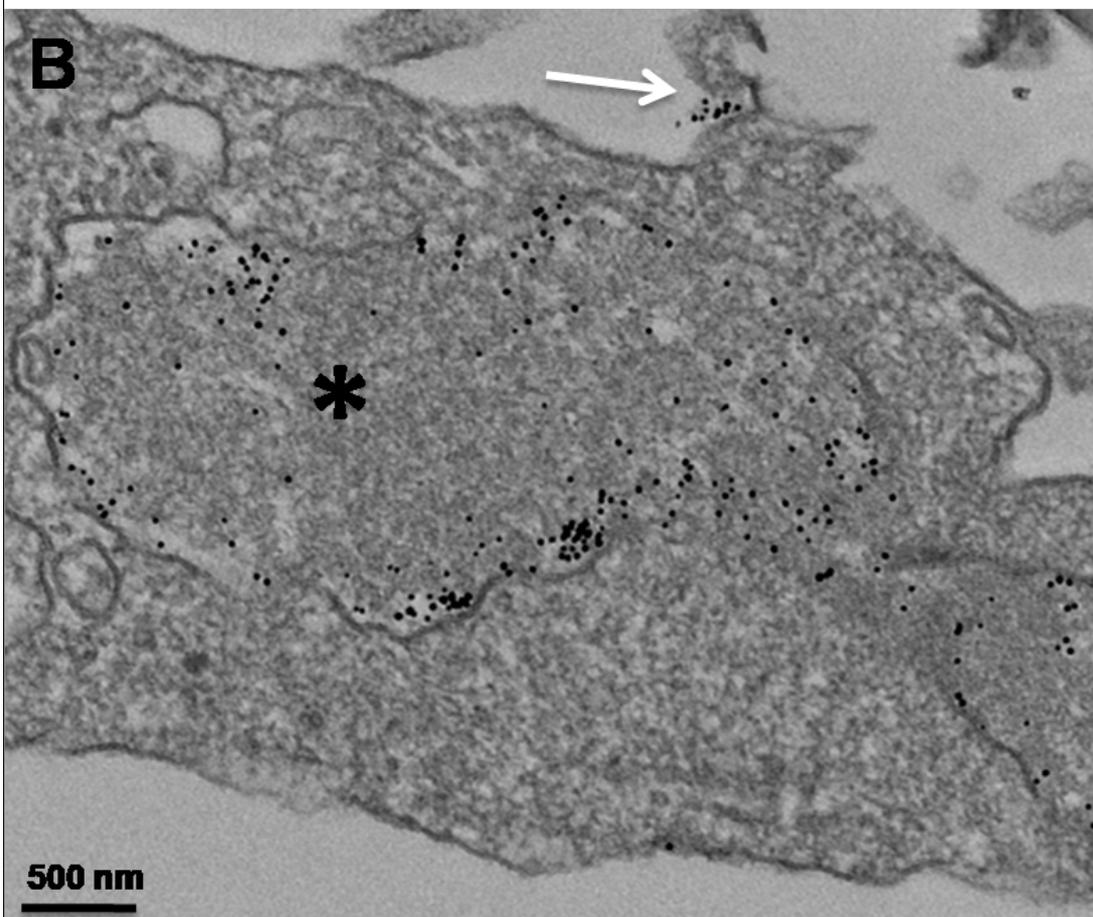
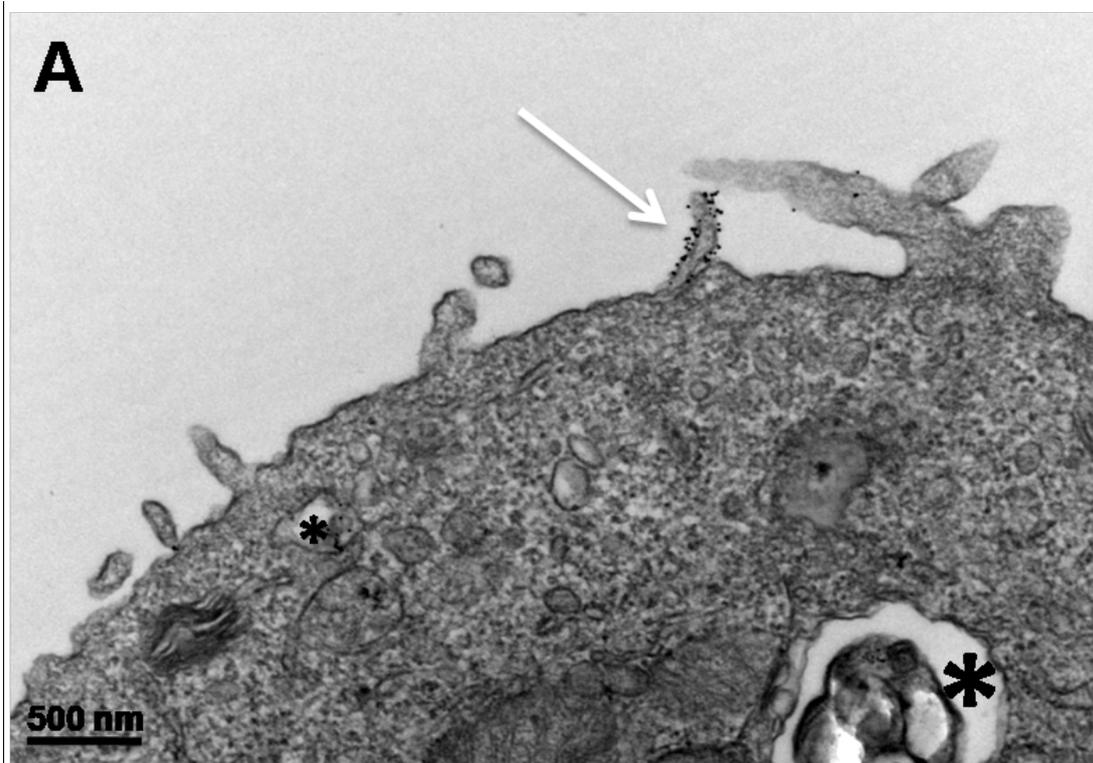


Figura 35. Endocitose da célula hospedeira da linhagem LLC MK₂, marcada com ouro revestido por albumina. (A) Em asterisco é possível observar vesículas de endocitose contendo partículas de ouro, bem como uma projeção de membrana revestida pelas marcações (seta), (B) visto também em outras células, compartimentos endocíticos intracelulares (asterisco), e na superfície também (seta).

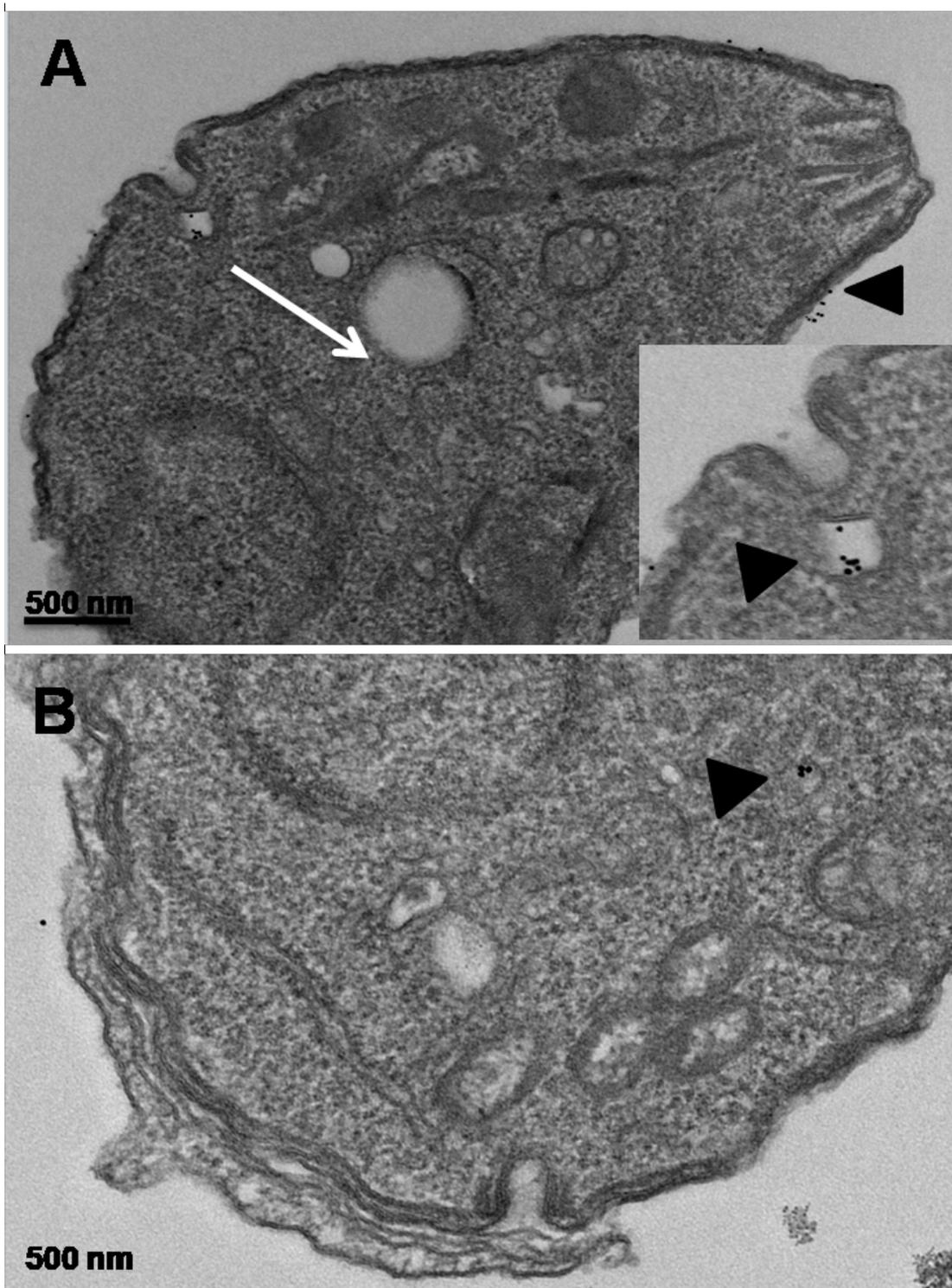


Figura 36. Marcadores de endocitose no taquizoíto durante a interação com as células hospedeiras. Células da linhagem LLC MK₂ interagindo com *T. gondii*, após sincronização dos eventos de entrada, (A) próximo ao microporo observamos vesículas de endocitose marcadas com ouro revestido por albumina (ponta de seta), bem como o distribuídas pelo corpo celular do parasito, (B) e em outras regiões, como vesículas internas (ponta de seta).

Os dados ultraestruturais observados nos experimentos com marcadores das vias endocíticas, pela microscopia eletrônica de transmissão, demonstraram as mesmas vesículas encontradas na região apical do *T. gondii*, vista em ensaios desse trabalho sem marcação para via endocítica, evidenciando uma região rica em vesículas (Figura 37), que sugerimos serem oriundas do taquizoíto. Foram realizadas também as medidas dessas vesículas encontradas na figura 37 através de MET, que mostraram a mesma variação observada na figura 32, com padrão de 80 nm e 100 nm sendo que há maior quantidade de vesículas apresentando 50 nm de diâmetro (cerca de 50% das vesículas analisadas também por MET), conforme mostrado anteriormente na figura 33.

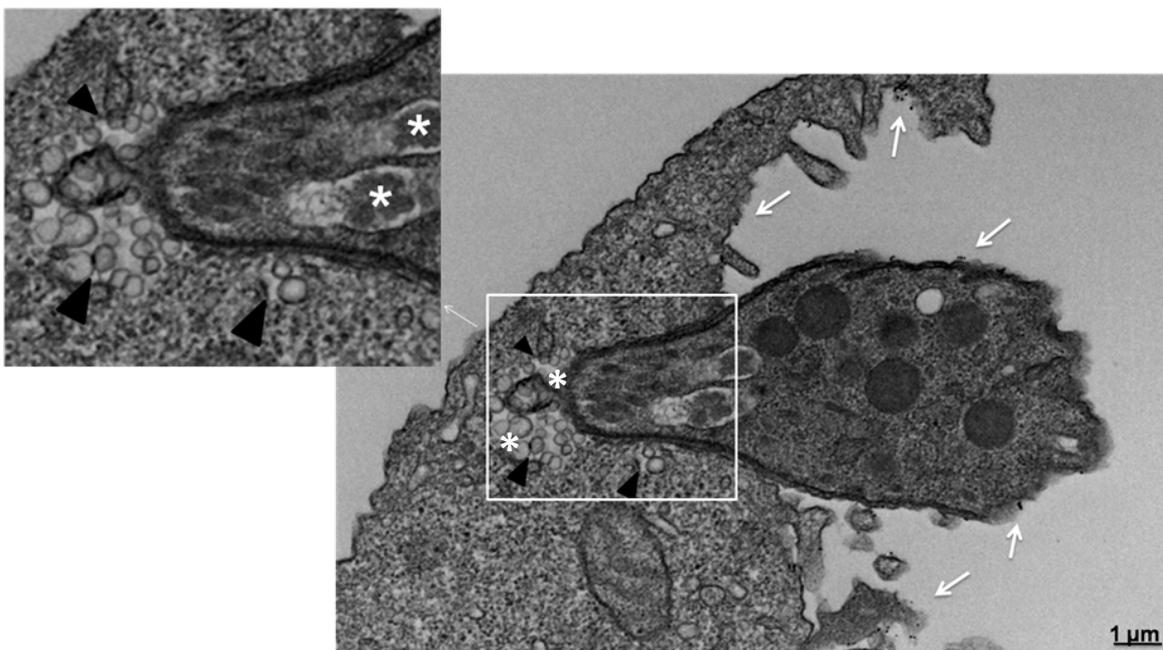


Figura 37. Processos endocíticos da célula da linhagem LLC MK2 interagindo com *T. gondii* por 15 minutos após sincronização dos eventos de entrada. Pode-se observar marcação de albumina ouro na superfície da célula hospedeira (seta), também é possível observar uma grande vesiculação (ponta de seta) na parte intracelular da célula hospedeira com do taquizoítio internalizado, bem como róptrias (asterisco) descarregando seu conteúdo.

Microscopia de força atômica (AFM)

A ultraestrutura do *T. gondii* e a sua invasão nas células hospedeiras foram observadas em imagens topográficas geradas por AFM, em que foram analisados os eventos iniciais de interação e até mesmo o processo da invasão do parasito, sendo evidente a participação da célula hospedeira (Figura 38).

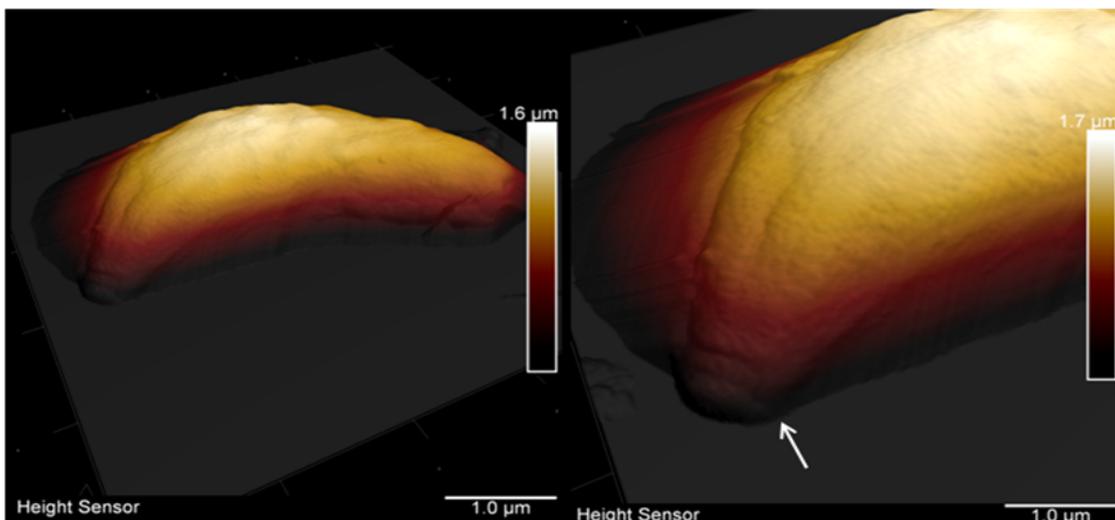


Figura 38: Ultraestrutura do *T. gondii* por AFM interagindo com células da linhagem LLC MK₂. Fixados com formaldeído após 15 minutos de interação, é possível observar todo corpo celular do taquizoítio com conóide (seta) interagindo com a célula hospedeira.

Na etapa inicial do processo de invasão, que consiste no reconhecimento da célula seguido da adesão do parasito, há a projeção do conóide (Figura 39) e ocorre a secreção de proteínas para a formação da junção móvel. Ainda durante os eventos iniciais, são observadas projeções de membrana da célula hospedeira ao redor do parasito (Figura 39, 40). Esse padrão se manteve durante o contato do taquizoítio com célula hospedeira

(Figura 40), durante a internalização do conóide e quando parte do corpo do parasito já se encontrava internalizado .

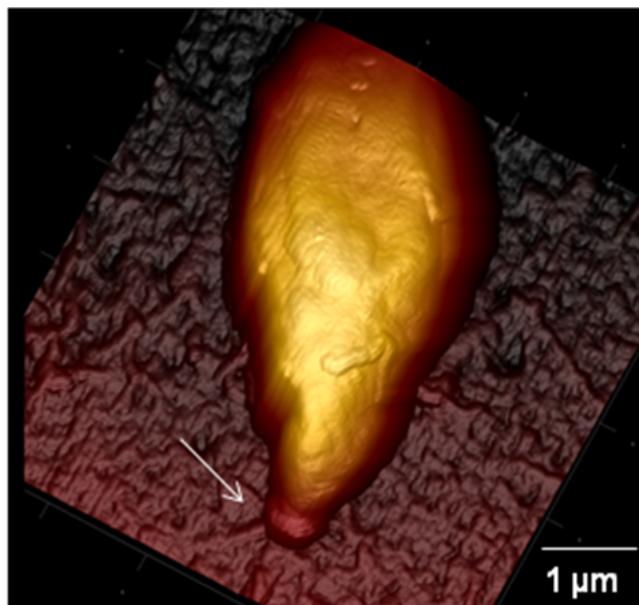


Figura 39: Projeção do conóide sobre a célula hospedeira por AFM. Seta apontando o conóide sobre a superfície da célula hospedeira, iniciando o processo de reconhecimento e adesão.

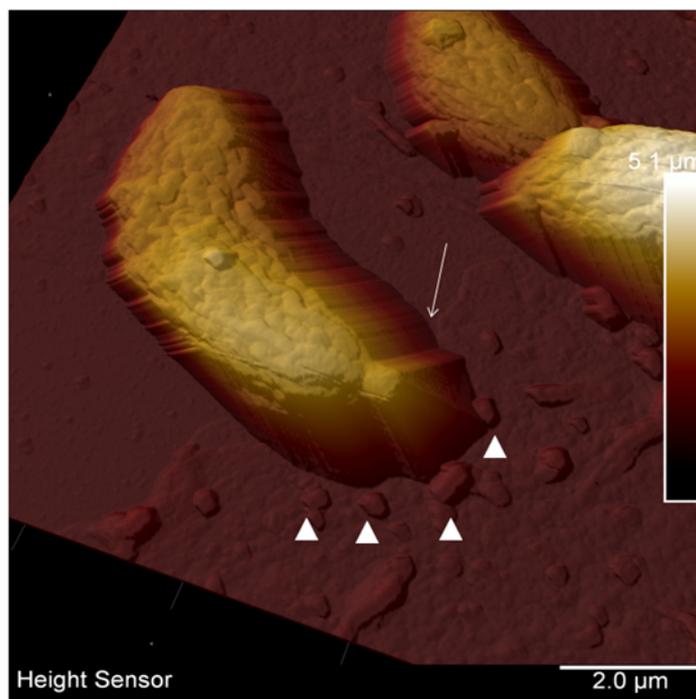


Figura 40: Contato inicial do taquizóito na superfície da célula hospedeira. Ponta de seta sinalizando projeções da membrana da célula hospedeira próximo da região de contato com o parasito. Seta aponta para o conóide.

A análise da topografia da imagem revelou uma internalização lateral do parasito, o taquizóito encontra-se em formato de “meia lua” (Figura 42), nessa região também é possível observar várias projeções da membrana da célula hospedeira, como alguns filopódios e nanotúbulos (Figura 41 e 42) vistos em todas as regiões na presença do parasito, um padrão encontrado a partir das informações obtidas de adesão e altura (Figura 43).

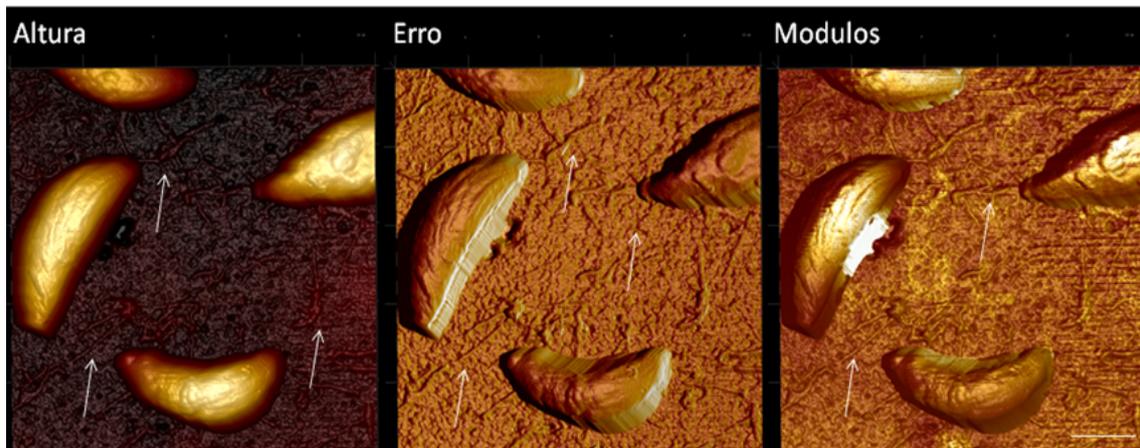


Figura 41: Projeções de filopódios emitidos pela célula hospedeira nas regiões em contato com o parasito. Através da emissão de sinais de altura e elasticidade próximos dessa região, possíveis filamentos emitidos da célula hospedeira (seta). Barra 1 μ m

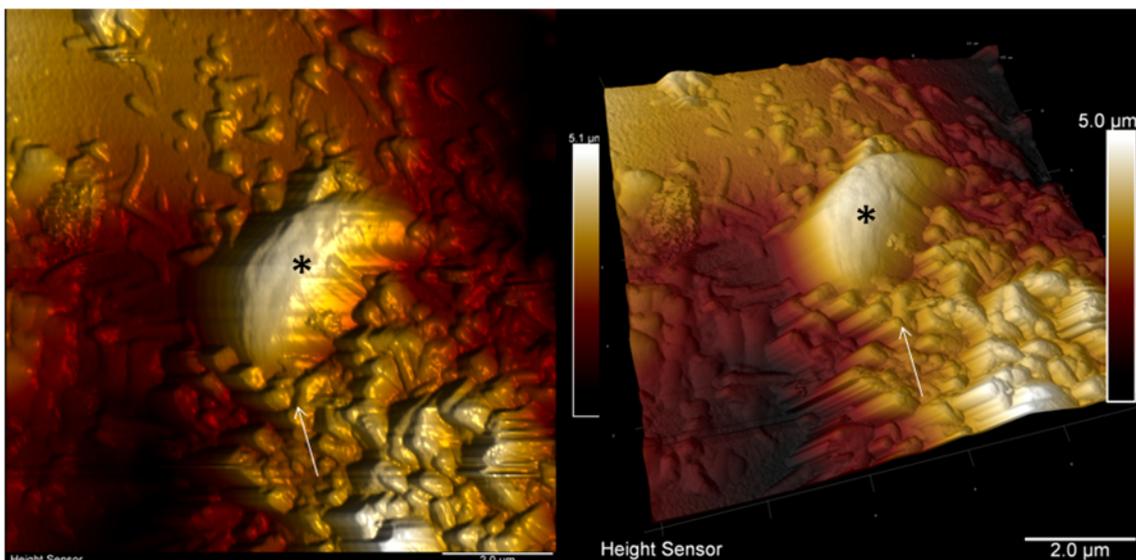


Figura 42: Representação tridimensional de imagens de altura, durante a invasão do taquizóito, tal como visto usando sonda de ponta única. As

setas indicam projeções da célula hospedeira, e a orientação lateral do parasito sinalizados com asterisco, durante a entrada.

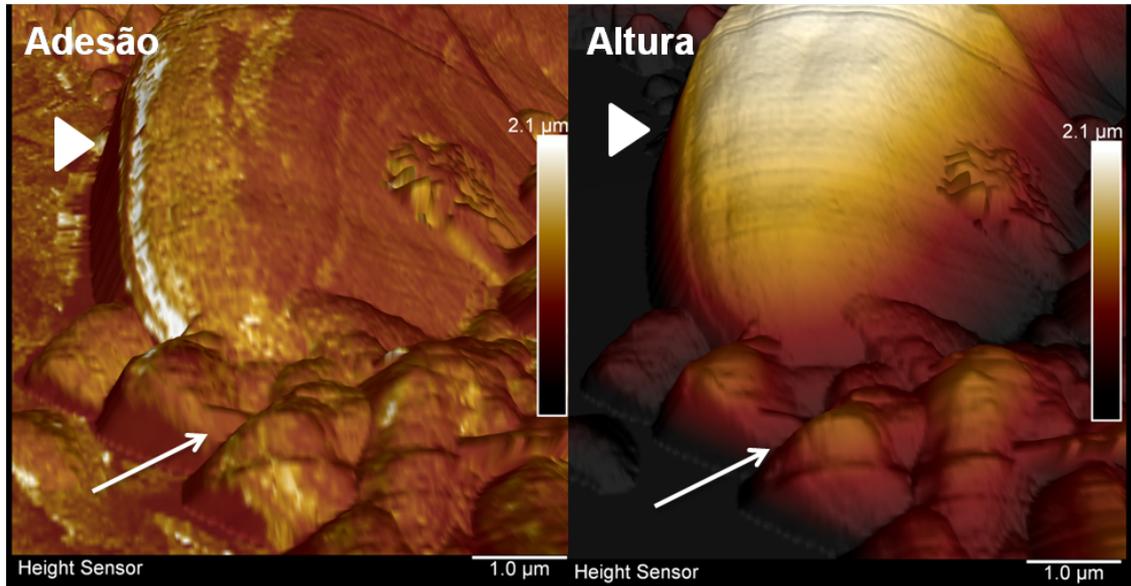


Figura 43: Projeções das células hospedeiras durante a entrada por AFM. Em ponta de seta o taquizóito envolvido por membrana da célula hospedeira indicado por seta, com inúmeras projeções nessa região de entrada.

A densidade na superfície nessa região da entrada do taquizóito é mais alta se comparada com a região onde houve a adesão, ou regiões onde tiveram apenas o contato. Na figura 44, através das leituras emitidas por sinais de elasticidade, foi possível diferenciar neste evento, o que seria indicativo da membrana da célula hospedeira com maior sinal de elasticidade capitado pela sonda, envolvendo o parasito com a parte não internalizada emitindo menor sinal de elasticidade.

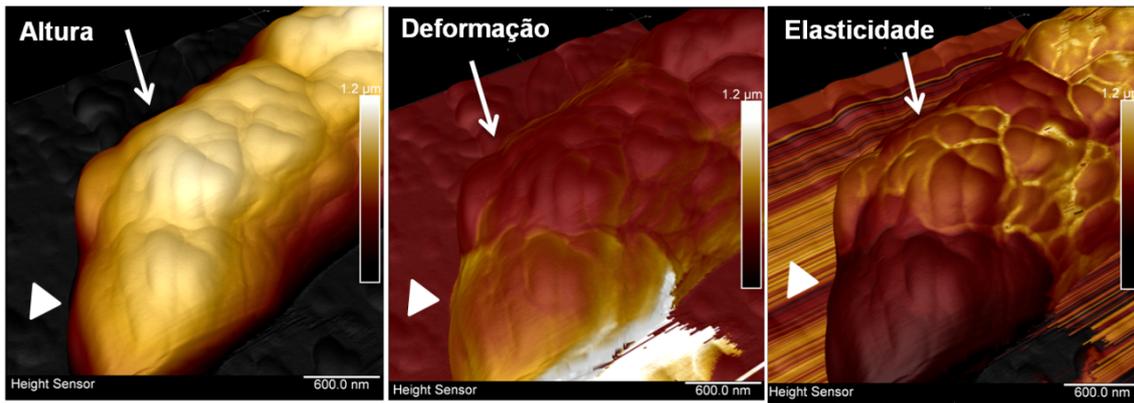


Figura 44: Membrana da célula hospedeira envolvendo o taquizoítos por AFM. Seta aponta para membrana da célula hospedeira envolvendo o parasito, com parte do corpo ainda não envolvido totalmente, sinalizado por ponta de seta.

Durante a varredura, a sonda do cantiléver varreu o parasito, e na ausência do mesmo, foi possível observar que a região onde o parasito estava aderido emitiu sinais de deformação, indicando possível rearranjo na superfície da membrana da célula hospedeira nessa região de contato e adesão (Figura 45).

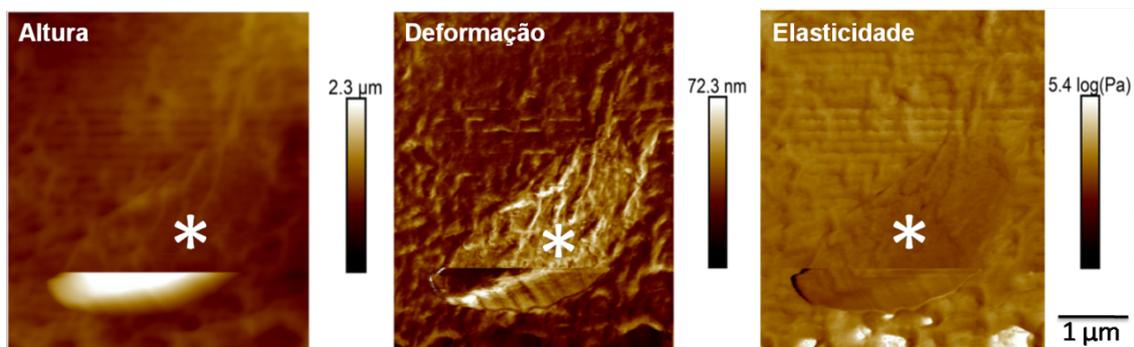


Figura 45: Superfície da célula hospedeira após varredura do parasito pela sonda. O asterisco sinaliza o que antes da varredura seria uma região de ancoragem do taquizoíta na célula hospedeira, que foi removido inesperadamente após procedimento com cantiléver.

6. Discussão

6.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O estudo do processo de interação entre protozoários patogênicos e a célula hospedeira, especialmente daqueles protozoários que desenvolveram a capacidade de penetrar e se multiplicar no interior da célula, tem sido objeto de estudo intenso. No caso específico do *Toxoplasma gondii*, evidências indicam que o mesmo pode ser internalizado em diferentes tipos celulares. No entanto, nem sempre o fato de entrar na célula assegura sucesso na infecção e multiplicação intracelular. Para que haja sucesso na infecção, o *T. gondii* utiliza um mecanismo de invasão considerado como ativo, com participação das organelas da extremidade apical do parasita. No presente trabalho analisamos em maior detalhe as fases iniciais do processo de interação, utilizando diferentes abordagens de microscopia. Para tal nos concentramos apenas em eventos que ocorrem nos primeiros quinze minutos da interação.

6.2. SINCRONIZAÇÃO DO PROCESSO DE ENTRADA

Visando ampliar as chances de encontro de etapas iniciais do processo de interação duas abordagens foram utilizadas. Primeiro a incubação prévia do sistema parasita-célula hospedeira a 4 ° C seguida de elevação para 37 ° C. Segundo o tratamento prévio das células hospedeiras com citocalasina D.

6.3. SINCRONIZAÇÃO POR BAIXA TEMPERATURA

Estudos prévios realizados com outros protozoários, como é o caso do *Trypanosoma cruzi* (de Araujo-Jorge *et al.*, 1989; Alves *et al.*, 1986) tem mostrado que a interação protozoário-célula pode ser dividida em duas etapas básicas (MacLaren & De Souza, 2002; Lebrun *et al.*, 2005). Primeiro ocorre a adesão do protozoário com a célula, iniciando um processo de reconhecimento celular. Em uma segunda etapa há o processo de internalização e este só ocorre a temperaturas acima de 18°C. Utilizamos essa estratégia no presente trabalho e para tal a incubação inicial ocorreu por 18 min a uma temperatura de 4 ° C e logo depois era levado para a estufa ajustada a 37°C, onde permanecia por 15 minutos, sendo em seguida fixada. Logo após à fixação observamos

muitos parasitas aderidos à superfície celular. No entanto, quando fomos observar as amostras por microscopia eletrônica de transmissão o número de parasitas aderidos era bem menor, indicando que muitos foram retirados da superfície durante as etapas de lavagem, pós-fixação, e desidratação, todas necessárias ao preparo de amostras para visualização por microscopia eletrônica de varredura ou de transmissão. Logo, é possível que a adesão do parasito seja relativamente fraca, o que faz com que sejam encontrados mais facilmente nas análises realizadas somente os protozoários que já iniciaram o processo de entrada, assim permanecendo aderidos. Sendo assim sugerimos que as modernas técnicas de criomicroscopia devem ser utilizadas para a realização de estudos futuros. Com essas técnicas, logo após a interação as preparações podem ser fixadas rapidamente com baixas temperaturas e levadas para observação também a baixa temperatura e observadas diretamente em microscópios trabalhando com voltagens maiores, da ordem de 200-300 KV, possibilitando inclusive a reconstrução tridimensional do com o uso de técnicas tomográficas (De Souza *et al*, 2007) .

Outros estudos propuseram sincronizar os eventos envolvendo o ciclo celular do *T. gondii* (Conde de Felipe *et al*, 2008). A morfologia e ultraestrutura são ferramentas tradicionais e poderosas no estudo das relações parasita-célula hospedeira, e foi evidente que empregando a sincronização da entrada para o estudo de detalhes dos eventos iniciais (tempo máximo de 15 minutos de contato do parasito com a célula) obteve-se êxito nas análises propostas, com a identificação de novos detalhes na morfologia do evento de entrada do *T. gondii*. O resultado da microscopia óptica e quantificações, que comparam a taxa de adesão nas condições com e sem sincronização, demonstraram a importância da sincronização, onde foi possível observar os eventos de entrada ativa e formação de junção móvel para o presente trabalho.

6.4. USO DE CITOCALASINA D

Na década de 70, um grupo de pesquisadores decidiu usar as citocalasinas, grupo de metabólitos fúngicos secundários que afetam diversas funções celulares, dentre as quais a inibição da fagocitose, para estudar os meios pelos quais o *T. gondii* tinham acesso ao domínio intracelular das células

hospedeiras (Ryning & Remington, 1978). Quando as células hospedeiras eram incubadas na presença de citocalasina B, que interfere no processo de polimerização de actina para a formação dos microfilamentos, verificaram que o processo de internalização do parasita era bloqueado. Por outro lado, há evidências de que o mesmo composto interfere com a motilidade do parasita, etapa importante do chamado processo ativo de invasão celular. As observações realizadas apontam que apesar de ocorrer penetração ativa do *T. gondii* durante a invasão da célula hospedeira, os elementos do citoesqueleto da célula hospedeira, como os filamentos de actina das células fagocíticas são importantes para a internalização dos taquizoítos (De Carvalho & De Souza 1989). Outros estudos usando parasitos e células hospedeiras mutantes, resistentes à citocalasina D, mostraram a importância não só de um intacto citoesqueleto de actina para a mobilidade do parasito como também a contribuição da actina do parasito na invasão de células fagocíticas ou não-fagocíticas (Dobrowolski & Sibley, 1996). Também tem sido mostrado que o composto bloqueia em cerca de 60% o egresso do parasita da célula hospedeira (Caldas *et al.*, 2009). O pré-tratamento de neutrófilos e eosinófilos com citocalasina D interfere de maneira significativa na internalização dos taquizoítos de *T. gondii* (MacLaren & De Souza, 2002). No presente estudo o tratamento com citocalasina D foi restrito à célula hospedeira, mas não aos taquizoítos de *T. gondii* e desta forma, conforme esperado e já descrito na literatura (Kumar *et al.*, 2019; Portes *et al.*, 2020), observou-se inibição significativa da internalização do parasito corroborando que a célula hospedeira tem papel crucial nesses mecanismos de entrada.

6.5. ANÁLISE MICROSCÓPICA DO PROCESSO INICIAL DE INTERAÇÃO

Diversas técnicas microscópicas tradicionais têm sido utilizadas para o estudo do processo de interação de *T. gondii* com a célula hospedeira (Dubey, 2021; de Souza e Portes in Martins –Duarte & Adesse, 2021). No entanto, a maior parte destes estudos estão centrados no desenvolvimento do parasita no interior do vacúolo parasitóforo. Por outro lado, há estudos detalhados usando microscopia de fluorescência mostrando claramente a associação de várias

proteínas secretadas pelo *T. gondii* e envolvidas na formação da junção móvel bem como sua associação com filamentos de actina da célula hospedeira (Lebrun *et al.*, 2005)

Microscopia de Fluorescência

Nossas observações confirmam os estudos prévios que mostram a concentração de proteínas como AMA1 e RON4 na região de constrição do taquizoíta em pleno processo de entrada na célula. Em associação a esse evento aplica à concentração de microfilamentos identificados pela marcação com faloidina.

A invasão de células hospedeiras por taquizoítos de *T. gondii* foi descrita como um processo que envolve secreção sequencial de proteínas dos micronemas e de róptrias, na extremidade apical do parasito (Carruthers & Sibley, 1997). O conteúdo secretado por essas organelas é responsável pela invasão do parasito e montagem da junção móvel. Nos resultados do presente trabalho, a utilização de marcadores específicos por microscopia de fluorescência mostrou que nos pontos com marcação das proteínas AMA1 e RON4, os filamentos de actina da célula hospedeira estavam presentes durante a entrada do taquizoito, o que nós sugerimos ser parte do processo de participação da célula hospedeira nesse evento, diferente do que outros autores sugeriram trabalhando com cepas diferentes de *T. gondii* (Whitelaw *et al.* 2017) que apontaram apenas para a actina do parasito ou subunidades do complexo MyoA-motor (o glideossomo), como o principal para o evento de entrada. Esse fato corrobora fortemente com a ideia de que a maquinaria do citoesqueleto da célula hospedeira desempenha um papel fundamental no processo de invasão do parasito, uma vez que a ligação entre proteínas secretadas pelos taquizoítos como RON4 (Wang-*et al.* ,2015) ao citoesqueleto de actina cortical da célula hospedeira, pode fornecer a resistência à tração necessária para facilitar a entrada do parasito na célula hospedeira (Guérin *et al.*, 2017).

Microscopia de Varredura

Em nosso estudo lançamos mão de duas modalidades de microscopia de varredura de alta resolução ainda muito pouco empregadas no estudo da fase inicial da interação do *T. gondii* com a célula hospedeira: microscopia eletrônica

de varredura (MEV) usando um equipamento com filamento de emissão de campo e detectores modernos de elétrons que permitem uma resolução da ordem de 0.8 nm e que requerem um fino revestimento com platina, e um microscópio de varredura baseado em íons de Hélio que fornece uma resolução da ordem de 0.3 nm em amostras que não são recobertas por metal, como requerido pelo MEV (revisão em De Souza & Attias, 2015). As imagens que obtivemos mostram claramente que o processo de entrada do parasita induz significativas alterações na superfície da célula hospedeira, que normalmente apresenta pequenas vilosidades, filopódios e lamelopódios, estruturas cuja biogênese dependem da organização do citoesqueleto da célula hospedeira. Uma função importante e essencial do citoesqueleto de actina nas células eucarióticas é promover a locomoção através da extensão de protrusões celulares (Pantaloni *et al.*, 2001). Essas protrusões participam de uma série de eventos: movimentos morfogênicos, que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário, movimentos neuríticos, durante o desenvolvimento do sistema nervoso, movimentos quimiotáticos emigração celular, são alguns dos exemplos. Dependendo da sua morfologia e do contexto celular, as diferentes protrusões podem receber nomes variados como: microvilosidades, lamelipódios, filopódios, ou cones de crescimento (Condeelis, 1993).

Os processos de protrusão precisam de um especializado sistema de filamentos de actina atuando na direção do movimento. Os filamentos de actina são polarizados, baseados no padrão criado quando a miosina se liga a actina, esses filamentos crescem rapidamente e pressionam a membrana para frente (Pantaloni *et al.*, 2001). Apesar de ambos serem projeções de membrana relacionadas com o citoesqueleto, os filopódios têm sido descritos em diversas situações biológicas. Os filopódios crescem de forma coordenada e em feixe, formando uma estrutura alongada (Pantaloni *et al.*, 2001).

Todas as estruturas mencionadas acima são normalmente observadas na superfície da maioria das células, incluindo as linhagens usadas em nosso trabalho. Verificamos, no entanto, que durante o processo de interação do *T. gondii* com a célula hospedeira, há uma intensa modificação na área da interação, envolvendo todas as estruturas mencionadas e outras mais.

Merece um destaque especial a presença de agregados de vesículas extracelulares, com diâmetro variável entre 50 e 80 nm e que parecem estar

em íntima interação com o parasita, ainda que não tenhamos feito nenhuma caracterização dessas vesículas é muito provável que correspondam à microvesículas extracelulares que podem ser originadas por diferentes mecanismos, incluindo os exosomas e ectosomas (Mathivanan & Simpson 2010; Ludwig & Giebel, 2012; Meldolesi, 2018; de Souza & Barrias, 2020). Certamente esta é uma área que merece estudos mais aprofundados.

Uma segunda modalidade de estrutura identificada no presente trabalho, não descrita previamente na interação do *T. gondii* com suas células hospedeiras, se caracteriza por apresentar um diâmetro de cerca de 3 a 7nm e se projetar quase que linearmente para fora da célula, alcançando comprimento de cerca de 8µm. Em alguns casos eles podem apresentar aspectos curvos e interagindo com o *T. gondii*, mesmo que este não esteja em contato direto com a superfície da célula hospedeira. Com base na sua morfologia, consideramos que sejam estruturas similares aos nanotubos de tunelamento ou citonemas (Rustom *et al.*, 2004; Onfelt *et al.*, 2006). Essa estrutura foi descrita inicialmente em 2004, quando Rustom e colaboradores relataram que células da linhagem PC12 (célula tumoral do tipo feocromocitoma de glândula adrenal) estão conectadas por longos canais de membranas que foram denominados como nanotubos de tunelamento (do inglês, “*tunneling nanotubes*”) (Rustom *et al.*, 2004). Essas finas protrusões podem nascer da célula e ir em direção à outra célula vizinha, como um filopódio (Rustom *et al.*, 2004). Organelas intracelulares, possivelmente vesículas ou corpos multivesiculares, assim como proteínas da superfície celular podem ser vistas movendo-se entre células conectadas via nanotubos de membrana (Rustom *et al.*, 2004). Esses canais diretos, de longa distância, podem permitir a troca de vesículas sem a necessidade de se ultrapassar a barreira hidrofóbica da membrana, apesar deste mecanismo ainda não ser bem compreendido. Em seguida, diversos trabalhos começaram a relatar a presença de nanotubos de membrana servindo como pontes para o transporte de bactérias (Onfelt *et al.*, 2006) e vírus, até mesmo o vírus HIV-1, de uma célula infectada para outra sadia (Sowinski *et al.*, 2008). A troca de proteínas de membrana facilitada pelos nanotubos pode ter muitas conseqüências, incluindo a disseminação de receptores que permitem a entrada de vírus (Tabiasco *et al.*, 2003). A participação de nanotubos na interação entre

protozoários e a célula hospedeira é ainda um campo em aberto e que merece ser investigada em profundidade. Não podemos excluir a possibilidade de que por ele haja transferência de moléculas da célula hospedeira para o parasita e que essas moléculas desencadeiem processos biológicos que possa estimular ou inibir sua entrada na célula.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

A célula hospedeira

Nossas observações confirmam as discutidas acima com base em imagens de microscopia de varredura. Esta modalidade de microscopia, no entanto, nos permitiu obter imagens indicativas de um processo de formação de um grande número de estruturas túbulo-vesiculares na área do citoplasma da célula hospedeira envolvida no processo de interação. Por serem estruturas presentes no interior da célula hospedeira, na região de contato com o parasita que entra na mesma, não puderam ser observadas pelas técnicas de microscopia de varredura. Uma possibilidade que merece novos estudos é de que este sistema seja induzido pela liberação de moléculas secretadas pelas róprias do parasita. Elas podem corresponder a um sistema endocítico ativado na região de entrada do parasita e que poderá levar à incorporação de componentes do meio necessários para propiciar o desenvolvimento do parasito no interior do vacúolo parasitóforo que como mostrado em estudos prévios (Sibley *et al.*, 1995) uma vez formado não se funde com o sistema endo-lisossomal da célula hospedeira. Também com os dados disponíveis não podemos excluir a possibilidade de que este sistema túbulo-vesicular corresponda a parte do retículo endoplasmático da célula hospedeira que, como mostrado em estágios mais avançados da interação, tende a circundar o vacúolo parasitóforo (Melo & De Souza 1997; Sinai *et al.*, 1997).

Imaginando que as vesículas poderiam corresponder a vesículas endocíticas, realizamos experimentos de interação onde o meio extracelular continha como traçador a enzima peroxidase ou partículas de outro coloidal revestidas por albumina. No entanto as imagens obtidas não permitem afirmar que as vesículas são de natureza endocítica uma vez que não observamos a presença dos traçadores no seu interior ainda que outras vesículas estivessem marcadas. Essas vesículas foram observadas em outros estudos, porém pouco

se discutiu sobre elas (Lebrun *et al.*, 2005). A invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira leva à formação do vacúolo, que é subsequentemente modificado pelos grânulos densos do taquizoíta já internalizado (Håkansson *et al.*, 2001). O vacúolo resultante resiste à fusão com compartimentos endocíticos e recruta o retículo endoplasmático e as mitocôndrias da célula hospedeira, se observando próximo a região os microtúbulos (De Souza *et al.*, 1988).

À medida que se estabelece o espaço intravacuolar fica evidente a associação de retículo endoplasmático (RE) com a membrana do VP, sendo essencial para o desenvolvimento intracelular do parasita (Sinai, *et al.* 1997). Embora o *T. gondii* não dependa da síntese de moléculas das células hospedeiras para a maioria de suas necessidades, ele pode sintetizar suas próprias proteínas e lipídios e pequenas moléculas importadas do citoplasma através dos canais de transporte da membrana do VP (Melo & de Souza, 1997). Alguns autores sugerem que a associação de RE em torno da membrana do VP que se reforça conforme ele cresce, enquanto os perfis RE que são internalizados pelo VP constituem um sistema de membrana independente e distinto dos nanotúbulos. Como também o compartilhamento de elementos RE e a associação de RE com o VP espalhados para outras áreas da célula hospedeira (Magno *et al.*, 2005).

O Parasita

Nos parasitas em fase inicial de interação observamos, tanto por microscopia de varredura quanto de transmissão, a presença de vesículas associadas à superfície do polo apical do taquizoíta com um diâmetro de cerca de 50nm. Importante enfatizar que nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, sempre que observávamos as vesículas, o conteúdo das mesmas, presentes na extremidade apical do parasito, se apresentava bem menos denso do que em parasitas que não estivessem em processo de invasão, o que caracteriza mobilização e esvaziamento do conteúdo das organelas. No conjunto as imagens obtidas nos levam a sugerir que o processo secretório na porção apical do *T. gondii* pode ocorrer via liberação de proteínas das mesmas passando pela formação de vesículas. Mais estudos são necessários para uma melhor caracterização dessas vesículas.

Microscopia de Força Atômica

Nossas observações usando microscopia de força atômica também apontam no sentido do envolvimento da célula hospedeira durante a interação com o taquizoíto. Essa metodologia foi inicialmente utilizada por Aikawa (1997) para analisar a interação de *Plasmodium* com eritrócitos e em estudos com outros protozoários (de Souza & Rocha, 2011). As informações captadas pela sonda transmitiram maior elasticidade juntamente com parte do taquizoíto sobreposto pela membrana da célula hospedeira, tendo em vista que o *T. gondii* possui em sua estrutura uma película trimembranar (Cintra & De Souza, 1985), assim essa sobreposição nessa região justifica o aumento da elasticidade no contato entre a sonda e a amostra, enquanto a parte inferior houve menor captação de elasticidade e altura, sugestivo da parte do corpo celular do parasito ainda não internalizado totalmente.

6.6. Marcações da superfície celular do *T. gondii* e Incorporação dos traçadores pelo parasita

Os experimentos de interação *T. gondii*-célula hospedeira na presença de traçadores adicionados ao meio de interação nos propiciou duas observações importantes. Primeiro o fato de que tanto a peroxidase quanto o complexo albumina-ouro se ligaram à superfície do taquizoíto. No caso da peroxidase a marcação estava distribuída por todo o corpo enquanto que a albumina não mostrava uma marcação contínua. Há relatos referentes ao reconhecimento dos marcadores de açúcares, como lectinas da *TgMIC1*, bem como presença de ácido siálico, observada em *Plasmodium falciparum*, encontrado com frequência nas extremidades glicanas, especialmente em glicoproteínas da superfície do *T. gondii*, exercendo papel relevante de adesão célula-célula (Marchant *et al*, 2012). Proteínas como a *TgMIC4* são responsáveis pelo reconhecimento dos domínios de galactose, que também demonstraram ser uma região passível de contribuir para a adesão do *T. gondii* à célula hospedeira (Marchant *et al*, 2012). Sugerimos que as marcações da superfície do taquizoíto extracelular com peroxidase e albumina-ouro coloidal

estejam ligadas a algumas dessas moléculas de reconhecimento ou adesão. A segunda observação que merece destaque é o fato de que partículas de outro coloidal tenham sido visualizadas na superfície celular do taquizoita na região onde se encontra o microporo, bem como em pequenas vesículas citoplasmáticas localizadas próximas ao microporo. Estas observações apontam para uma participação do microporo em atividades endocíticas do protozoário, tal como sugerido previamente (Nichols *et al.*, 1994). Embora descrito como um evento raro no caso de parasitas extracelulares, estudos recentes demonstraram que o *T. gondii* é capaz de realizar endocitose eficiente tanto no meio intracelular quanto no meio extracelular (Nolan *et al.*, 2017). Semelhante ao *Plasmodium*, uma das funções da endocitose durante o período intracelular é a absorção de componentes da célula hospedeira. Metabólitos da célula hospedeira, tais como purinas ou açúcares, provavelmente são incorporados por um processo de difusão livre do metabólito através dos poros na membrana do VP e transportadores localizados na membrana plasmática do parasita (Nolan *et al.*, 2017).

CONCLUSÕES

A sincronização dos eventos de entrada do *T. gondii* em células hospedeiras LLCMK₂ contribuíram para observação de novos detalhes dos eventos da adesão e entrada, como projeções de superfície da membrana plasmática da célula hospedeira, pseudopodos, nanotúbulos irradiando da célula hospedeira em direção parasito.

- Identificou-se nanotubos com 8µm de comprimento e 3 a 7 nm diâmetro partindo da célula hospedeira e se projetando em direção ao parasito de forma a envolvê-lo.
- Durante a entrada do taquizoito na célula hospedeira, foi possível constatar por MEV, uma vesiculação intensa, com características morfológicas de exossomos, nessa região.

- Foram encontrados por MET vesículas que apresentaram tamanho variando de 50 a 100nm de diâmetro, na região de entrada onde se formou a junção móvel.
- Os traçadores das vias endocíticas marcaram a superfície celular do taquizoita, bem como a região do microporo, o que deve estar ligado a componentes citoplasmáticos do parasito.
- Observamos pequenas vesículas citoplasmáticas localizadas próximas ao microporo com os marcadores das vias endocíticas, caracterizando endocitose nessa região.
- Nas células tratadas previamente com citocalasina D, não houve a entrada *T. gondii*, e na região de adesão observamos vesículas com tamanhos que variavam de 50 a 100nm de diâmetro, como encontradas também na interação sem tratamento, em toda região de contato entre o taquizóito e as células hospedeiras.
- Através da microscopia de força atômica observamos, após varredura do taquizoito aderido, uma reorganização da superfície da membrana da célula hospedeira, indicando uma ancoragem do parasito.

REFERÊNCIAS

- ADL SM, SIMPSON AG, LANE CE, LUKES J, BASS D, BOWSER SS,. The revised classification of eukaryotes. **J Euk Microbiol.**; v.59 p., 92-99. 2012
- AIKAWA, M., MILLER, L. H., JOHNSON, J. AND RABBEGE, J. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. **J. Cell Biol.** v.77, p., 72-82. 1977.
- AIKAWA, M.. *Studies on falciparum malaria with atomic force and surface potential microscopes.* **Annals of Tropical Medicine And Parasitology**, v.,91(7),p., 689–692. 1997
- ALVES, M.J.; ABUIN, G.; KUWAJIMA, V. Y.; COLLI, W. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical Parasitology** v.21, 75 – 82, 1986
- ATTIAS, M. & SOUZA, W. A review of the Apicomplexa cytoskeleton. **Trends in Molecular and Cell Biology**, 4: 67-79, 2010
- ATTIAS, M., TEIXEIRA, D. E., BENCHIMOL, M., VOMMARO, R. C., CREPALDI, P. H., & DE SOUZA, W. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. **Parasites & vectors**, v., 13, p., 2 - 13, 2020.
- AZZOUZ N, KAMENA F, LAURINO P, KIKKERI R, MERCIER C, CESBRON-DELAUW MF, DUBREMETZ JF, DE COLA L, SEEBERGER PH. *Toxoplasma gondii* secretory proteins bind to sulfated heparin structures. **Glycobiology**. v.23 p., 106-112. 2013
- BAHIA-OLIVEIRA LM, JONES JL, AZEVEDO-SILVA J, ALVES CC, ORÉFICE F, ADDISS DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerg Infect Dis**.; v., 9, p.,55-62, 2003.
- BRASIL. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Ministério da Saúde: Brasília, 2015. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guia_bolso.pdf
- BESTEIRO S, DUBREMETZ J.,LEBRUM M., I.The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. **Cell Microbiology**. ; v. 13: p.,797-805 2011.
- CALDAS, L. A.; DE SOUZA, W. ; ATTIAS, M. Microscopic analysis of calcium ionophore activated egress of *Toxoplasma gondii* from the host cell. **Veterinary Parasitology**, V., 167, Issue 1, , P., 8-18, 2009.
- CALDAS LA, DE SOUZA W. A Window to *Toxoplasma gondii* Egress. **Pathogens**, v., 7, p., 69-73 2018

CALDAS LUCIO AYRES, SEABRA SERGIO HENRIQUE, ATTIAS MÁRCIA, DE SOUZA WANDERLEY. The effect of kinase, actin, myosin and dynamin inhibitors on host cell egress by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology International**, v., 62, p., 475–482, 2013.

CARRUTHERS VB, HUYNH MH,. *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. **PLoS Pathog.** v.,2, p.,84 - 90. 2006

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

CARRUTHERS VB, ROIKO MS, Functional dissection of *Toxoplasma gondii* perforin-like protein 1 reveals a dual domain mode of membrane binding for cytolysis and parasite egress. **The Journal of biological chemistry**, v., 288, p., 8712–8725, 2018

CAVALCANTE-COSTA, V. S., COSTA-REGINALDO, M., QUEIROZ-OLIVEIRA, T., OLIVEIRA, A., COUTO, N. F., DOS ANJOS, D. O., LIMA-SANTOS, J., ANDRADE, L. O., HORTA, M. F., & CASTRO-GOMES, T. *Leishmania amazonensis* hijacks host cell lysosomes involved in plasma membrane repair to induce invasion in fibroblasts. **Journal of cell science**, v.,132, p., 18 – 26, 2019.

CHARRON AJ, SIBLEY LD. Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. **Traffic**, v. 42, p. 26 – 29, 2004.

CINTRA, W. M. ; De SOUZA, W. Distribution of Intramembranous Particles and Filipin-Sterol Complexes in the cell membranes of *Toxoplasma gondii*. **European Journal of Cell Biology** , Stuttgart, Alemanha, v. 37, n.1-6, p. 63-69, 1985.

CONDE DE FELIPE, MM, LEHMANN, MM, JEROME, ME, & WHITE, MW A inibição do crescimento de *Toxoplasma gondii* pelo ditiocarbamato de pirrolidina é específica do ciclo celular e leva à sincronização da população. **Parasitologia molecular e bioquímica** , v.,157 (1), p., 22-31, 2008

CONDEELIS, J. Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. **Annu Rev Cell Biol** v.,9, p., 411-444. 1993

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**, v.,125, p., 261–274, 2006

DE ARAÚJO-JORGE TC. The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.,84, p., 441–462 1989

DE SOUZA, W. ; ATTIAS, M . New views of the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole as revealed by Helium Ion Microscopy (HIM). **Journal of Structural Biology (Print)**, v. 190, p. S1047-8477(15)0-10, 2015.

DE SOUZA W, BARRIAS ES. Membrane-bound extracellular vesicles secreted by parasitic protozoa: cellular structures involved in the communication between cells. **Parasitology Research**, v., **119**, p.,2005–2023, 2020.

DE SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, ÉRICA DOS S.; LEMGRUBER, L.; ATTÍAS, M.; VOMMARO, R. C. Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.

DE SOUZA, W ; ROCHA, G. M. . Atomic force microscopy: a tool to analyze the structural organization of pathogenic protozoa. **Trends in Parasitology** , v. 27, p. 160-167, 2011.

DE SOUZA, W ; PORTES, J. A.(ed.). *Toxoplasma gondii* entry Mechanisms and establishment of Parasitophorous vacuole. In: MARTINS-DUARTE, Erica S.; ADESSE, Daniel. *Toxoplasma gondii: prevalence and role in health and disease*. **New York: Nova Medicine & Health**, 2022. p. 41-80.

DOBROWOLSKI J, SIBLEY LD. The role of the cytoskeleton in host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Behring Institute Mitteilungen**, v.,99, p., 90–96, 1997.

DUBREMETZ JF. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. **Cell Microbiology**. 2007

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

DUBEY, J. P. LAPPIN, M. R. *Toxoplasmosis and neosporosis*. In: **Infectious diseases of the dog and cat**. 3 ed. St. Louis: Craig E. Greene. Cap. 80, p. 754-775. , 2006

DUBEY JP, LINDSAY DS, SPEER CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinic Microbiolgy Review**. V., 11, p., 267–299,1998

DUBEY, J., LAGO, E., GENNARI, S., SU, C., & JONES, J. *Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: High prevalence, high burden of disease, and epidemiology*. **Parasitology**, v., 139, p.,1375-1424, 2012.

Dubey, J., Murata, F., Cerqueira-Cézar, C., Kwok, O., & Villena, I. Congenital toxoplasmosis in humans: An update of worldwide rate of congenital infections. **Parasitology**, v.,148(12), p.,1406-1416, 2021.

DUMÈTRE A, LE BRAS C, BAFFET M, MENECEUR P, DUBEY JP, DEROUIN F, DUGUET JP, JOYEUX M, MOULIN L. Effects of ozone and ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v.,153, p., 209–213, 2008

ESMERINI, P. O.; GENNARI, S. M.; PENA, H. F. Analysis of marine bivalve shellfish from the fish market in Santos city, Sao Paulo state, Brazil, for *Toxoplasma gondii*. **Vet. Parasitol.** v. 170, p. 8 –13, 2010.

- FERNANDES MC, CORTEZ M, FLANNERY AR, TAM C, MORTARA RA, ANDREWS NW. Trypanosoma cruzi subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **The Journal of experimental medicine**, v.,208, p., 909–921. 2011
- GUÉRIN, A., CORRALES, R. M., PARKER, M. L., LAMARQUE, M. H., JACOT, D., EL HAJJ, H., LEBRUN, M.. *Efficient invasion by Toxoplasma depends on the subversion of host protein networks.* **Nature Microbiology**, v.,210, p.,1358–1366., 2017.
- HÅKANSSON, S., CHARRON, AJ, & SIBLEY, LD . Toxoplasma evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. **The EMBO journal**, v., 20, p.,3132–3144, 2001
- HORTA MF, ANDRADE LO, MARTINS-DUARTE ÉS, CASTRO-GOMES T. Cell invasion by intracellular parasites - the many roads to infection. **Journal of cell science**, v., 133, p., 232 – 242, 2020
- KUMAR GA, KARMAKAR J, MANDAL C, CHATTOPADHYAY A. Leishmania donovani Internalizes into Host Cells via Caveolin-mediated Endocytosis. **Scientific reports**, v.,9, p., 26- 36 2019.
- LEBRUN M, MICHELIN A, EL HAJJ H, PONCET J, BRADLEY PJ, VIAL H, DUBREMETZ JF. The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during Toxoplasma gondii invasion. **Cellular Microbiology**, v.,7, p., 1823–1833, 2005
- LUDWIG AK, GIEBEL B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. **Internacion Journal Biochem Cell Biol.** v.,44, p., 11 - 21. 2012
- LUFT, BJ E REMINGTON, JS Toxoplasmic Encephalitis in AIDS. **Doenças Infeciosas Clínicas**, v.,15, p., 211-222, 1992.
- MATHIVANAN S, JI H, SIMPSON RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of proteomics**, p., 73, p.,1907–1920. 2010
- MACLAREN A, ATTIAS M, DE SOUZA W. Aspects of the early moments of interaction between tachyzoites of Toxoplasma gondii with neutrophils. **Veterinary Parasitology**, v.,125, p., 302 – 312, 2004.
- MACLAREN A, DE SOUZA W. Further studies on the interaction of Toxoplasma gondii with neutrophils and eosinophils. **J Submicrosc Cytol Pathol.** v.,34(1), p., 99-104. 2002.
- MAGDESIAN MH, GIORDANO R, ULRICH H, JULIANO MA, JULIANO L, SCHUMACHER RI, COLLI W, ALVES MJ. Infection by Trypanosoma cruzi. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. **The Journal of biological chemistry**, v., 276, p., 19382–19389. 2001

MAGNO RC, LEMGRUBER L, VOMMARO RC, DE SOUZA W, ATTIAS M. Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. **Microscopy research and technique**, v.,67, p.,45–52.. 2005

MAGNO, R., STRAKER, L., DE SOUZA, W., & ATTIAS, M.. Inter-relações entre o vacúolo parasitóforo de *Toxoplasma gondii* e as organelas da célula hospedeira. **Microscopy and Microanalysis**, v.,11 (2), p.,166-174. (2005)

MCFADDEN GI. The apicoplast. **Protoplasma**, v.,248, p., 641–650 2011

MELO, E. J. T. ; DE SOUZA, W. . Effect Of Various Dispositive Enzymes On The Interaction Of *Toxoplasma Gondii* With Macrophages. **CELL STRUC. FUNC.**, v. 21, p. 1-6, 1997.

MELDOLESI J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. **Current Biology**, v., 28, p., 435 – 444, 2018

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

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

MORENO SN, ZHONG L. Acidocalcisomes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Biochem J**. 313(Pt 2):655–9 1996;

MORISAKI JH1, HEUSER JE, SIBLEY LD.. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. **Journal Cell Scienc**; v.,108 (Pt 6): p., 2457-2464. 1995.

MORO JC, MOREIRA NM. Clinico-epidemiological and sociodemographic profile of HIV/AIDS patients who are co-infected with *Toxoplasma gondii* in the border region of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências- HEALTH SCIENCES** . V., 94, 2020.

MORRISSETTE NS, SIBLEY LD. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. **Microbiology Molecular Biology Rev**, v., 66,p., 21–38. 2002

NICHOLS BA, CHIAPPINO ML, PAVESIO CE. Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v., 80, p., 91–98 1994.

NICOLLE C, MANCEAUX L Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Compte Rendu de l'Academie des Sciences Paris**, v.,148, p., 369-372 1909.

NOLAN, S. J., ROMANO, J. D., & COPPENS, I. Host lipid droplets: An important source of lipids salvaged by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **PLoS pathogens**, v.13, p., 94 – 98, 2017.

ONFELT, B., NEDVETZKI, S., BENNINGER, R.K., PURBHOO, M.A., SOWINSKI, S., HUME, A.N., SEABRA, M.C., NEIL, M.A., FRENCH, P.M., AND DAVIS, D.M. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. **J Immunol** v.,177, p., 76-83, 2006.

OPITZ C, SOLDATI D. 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Molecular Microbiology**. v.,45(3) p.,597-604. 2002

PANTALONI, D., LE CLAINCHE, C., AND CARLIER, M.F. . Mechanism of actin-based motility. **Science** 292, 1502-1506. 2001

PAREDES-SANTOS TC, DE SOUZA W, ATTIAS M. Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. **Journal Struct Biol**. v.,177, p., 420–430 2012.

PORCHET-HENNERE, E. , TORPIER, G. Relations entre *Toxoplasma* et sa cellule-hote . **Protistologica**, v.,19 : p.,357 - 370 . 1983.

PORTES J, BARRIAS E, TRAVASSOS R, ATTIAS M, DE SOUZA W. *Toxoplasma gondii* Mechanisms of Entry Into Host Cells. **Front Cell Infect Microbiol**, v., 10, p., 294 2020.

PUTIGNANI, L.; MANCINELLI, L.; DEL CHIERICO, F.; MENICHELLA, D.; ADLERSTEIN, D.; ANGELICI, M. C.; et al. Investigation of *Toxoplasma gondii* presence in farmed shellfish by nested-PCR and real-time PCR fluorescent amplicon generation assay (FLAG). **Exp. Parasitol**. v. 127, p. 409–417, 2011.

ROBERT-GANGNEUX F, DARDÉ ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinic Microbiology**, v., 25, p., 264–296, 2012

Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., and Gerdes, H.H. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. **Science** v.,303, p.,1007-1010. 2004.

SEABRA SH, DAMATTA RA, DE MELLO FG, DE SOUZA W. Endogenous polyamine levels in macrophages is sufficient to support growth of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v.,40, p., 450 – 455, 2004.

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

SIBLEY LD, NIESMAN IR, PARMLEY SF. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. **Journal Cell Science**, v., 108, p.,69-77, 1995.

SIBLEY, L.D., AND N.W. ANDREWS. Cell invasion by un-palatable parasites. **Traffic** (Copenhagen, Denmark), v.,1, p.,100–106, 2000.

- SINAI AP, WEBSTER P, JOINER KA. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. **J Cell Sci.** v., 110, p., 17 – 28, 1997
- SLOT, J. W., & GEUZE, H. J. A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. **European journal of cell biology**, v., 38, p., 87–93, 1985.
- SOLDATI D, MEISSNER M. *Toxoplasma* as a novel system for motility. **Curr Opin Cell Biology**, v., 16 p 32 -40 2004.
- SOWINSKI, S., JOLLY, C., BERNINGHAUSEN, O., PURBHOO, M.A., CHAUVEAU, A., KOHLER, K., ODDOS, S., EISSMANN, P., BRODSKY, F.M., HOPKINS, C. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. **Natural Cell Biology** v., 10, p., 211-219, 2008.
- SPLENDORE A. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. **Rev Soc Sci Sao Paulo** v., 3: p., 109-112. 1908.
- TABIASCO, J., VERCELLONE, A., MEGGETTO, F., HUDRISIER, D., BROUSSET, P., AND FOURNIE, J.J. Acquisition of viral receptor by NK cells through immunological synapse. **The Journal of Immunology**, v., 170, p., 5993–5998, 2003
- TORREY EF, YOLKEN RH. *Toxoplasma* oocysts as a public health problem. **Trends Parasitol** v., 29 p., 380 - 384 2013.
- VACCARO, CAMILA. Toxoplasmose ocular no município de Erechim (RS). **Revista Multidisciplinar em Saúde**. v., 57, p., 25 – 28. 2021.
- WANG Y, YIN H. Research advances in microneme protein 3 of *Toxoplasma gondii*. **Parasites Vectors**. 8, 384 2015
- WHITELAW JA, LATORRE-BARRAGAN F, GRAS S, PALL GS, LEUNG JM, HEASLIP A, EGARTER S, ANDENMATTEN N, NELSON SR, WARSHAW DM, WARD GE, MEISSNER M. Surface attachment, promoted by the actomyosin system of *Toxoplasma gondii* is important for efficient gliding motility and invasion. **BMC Biol.** v., 15, 2017.
- ZHANG Y, LAI BS, JUHAS M, ZHANG Y. *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis. **Microbiology Research**. v., 227, p., 26 -29, 2019