

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

**ASPECTOS CELULARES DA INTERAÇÃO DE CÉLULAS
ENDOTELIAIS DA VEIA DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO E
*TOXOPLASMA GONDII***

NATASSIA SILVA DE ARAÚJO

Rio de Janeiro
Novembro de 2017

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

**ASPECTOS CELULARES DA INTERAÇÃO DE CÉLULAS
ENDOTELIAIS DA VEIA DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO E
*TOXOPLASMA GONDII***

por

NATASSIA SILVA DE ARAÚJO

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

Orientadora: Dr^a. Helene Santos Barbosa

Rio de Janeiro
Novembro de 2017

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

**ASPECTOS CELULARES DA INTERAÇÃO DE CÉLULAS
ENDOTELIAIS DA VEIA DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO E
*TOXOPLASMA GONDII***

Apresentada por:

NATASSIA SILVA DE ARAÚJO

Banca examinadora:

Andréa Henriques-Pons - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz - Presidente
Ana Carolina Stumbo - Instituto de Biologia - UERJ
Laís de Carvalho - Instituto de Biologia - UERJ

Erika Afonso Costa Cortez - Instituto de Biologia - UERJ - revisora e suplente
Rubem F. Sadok Menna Barreto - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz - suplente

Aprovada em: ____/____/____

Araujo, Natassia Silva de.

Aspectos celulares da interação de células endoteliais da veia do cordão umbilical humano e *Toxoplasma gondii* / Natassia Silva de Araujo. - , 2017.
124 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Helene Santos Barbosa .

Bibliografia: f. 107-124

1. *Toxoplasma gondii*. 2. Célula endotelial da veia do cordão umbilical humano. 4. Cistogênese . 5. Corpúsculos de Weibel-Palade. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Esta dissertação foi desenvolvida sob orientação da Dra. Helene Santos Barbosa no Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, RJ, Rio de Janeiro teve o apoio financeiro das seguintes entidades:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

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

Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde - PAPES VI (Fiocruz)

Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz

“O Senhor é o meu pastor, nada me faltará. Deitar-me faz em verdes pastos guia-me mansamente a águas tranquilas. Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome. Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e teu cajado me consolam... Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida”. **Salmos 23:1-6**

**Dedico esta dissertação a todas
as pessoas que acreditaram em mim**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sei que se estou hoje aqui, é pelo o amor que me sustenta e ampara a cada passo que dou.

À minha família pelo amor e apoio incondicional. O meu amor por vocês transcende essa vida.

Minha orientadora Dra Helene. Não existe outra pessoa que poderia ter me orientado durante o mestrado. Tenho absoluta certeza que Deus lhe enviou como um presente. Gratidão por todo o ensinamento profissional e pessoal. Gratidão pelos pães e a torta de limão.

À Mariana Acquarone por ter acreditado em mim e me levado até essa oportunidade.

Às minhas companheiras: Mariana Garcia, gratidão por permitir que nossos caminhos se unissem em busca de algo maior, por ser minha inspiração e por cada ligação que fez quando eu precisei; Liandra, te conhecer foi uma das maiores dádivas que eu tive, gratidão por ser o melhor abraço, por me tirar o mais sincero riso. Sua existência é obra de Deus para esse mundo. Bárbara, gratidão pela amizade, solidariedade e risadas. Você é muito especial pra mim. O que construímos nesses anos é para sempre. Eu vou, mas meu coração cheio de saudade ficará com vocês.

Ao meu grande e fiel amigo Bruno Vieira. Gratidão por absolutamente tudo que você é.

Aos meus amigos Gabriel, Heloá e Jéssica. Gratidão pela irmandade e pela lealdade de sempre.

À minha melhor amiga Juliana, por estar comigo desde a prova, pelo seu amor e por ter sonhado e lutado comigo. Esse trabalho é nosso.

À Renata Morley que se tornou uma grande amiga, muita gratidão pela sua luz, pelo seu carinho, nunca vou me esquecer de todas as vezes que você me olhou nos olhos e disse que tudo ia dar certo. Gratidão pelos cordões. Você tem minha admiração eterna.

Aos amigos incríveis que conheci aqui: Yuli, Mayara, Keli, Thyago, Ingrid, Camila e Samuel. Gratidão por todos os ótimos momentos que tivemos juntos.

À Dra Carolina Stumbo e Camila Luna por terem me ensinado com todo carinho a cultura que se tornou o que eu mais amei fazer durante o mestrado.

A toda equipe do IPB que sempre me recebeu com grande gentileza.

Ao LBE, pela companhia diária e pelos ensinamentos. Em especial Erick, por sempre me acrescentar. Você é um profissional sem igual, foi uma honra ter tido suas aulas e dicas. Sandra pelo trabalho impecável e suporte.

Às minhas meninas Julia e Bruna pelo grande prazer de ensinar o pouco que sei a vocês. Gratidão pelo companheirismo.

À Vânia, Priscila e Joel, por terem sempre uma palavra de ânimo e por me lembrarem dos planos de Deus para a minha vida.

À equipe da limpeza pelo carinho diário, em especial a Paula por ter me ajudado em um momento delicado no qual sua generosidade acalmou meu coração.

Ao Cnpq pelo suporte necessário.

À Fundação Oswaldo Cruz, por cada professor, cada palestra, cada oportunidade. Realmente não tenho palavras para descrever o tamanho desse lugar para a minha formação. Apenas quero expressar minha eterna gratidão a essa casa sagrada.

“Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer dividir um planeta e uma época com vocês”.

Carl Sagan

Resumo

O *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório com distribuição cosmopolita, é de grande relevância médica e veterinária. A toxoplasmose congênita representa uma das mais sérias consequências da infecção aguda na gestante, podendo acarretar: transmissão vertical (19%); aborto (9%) ou má formação do feto (30%). Durante a transmissão congênita, as células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVEC) estão inseridas na principal rota de transmissão da infecção vertical. No entanto, esse modelo celular tem sido pouco explorado no contexto da toxoplasmose experimental. Assim, o principal objetivo dessa dissertação foi analisar aspectos celulares da interação de *T. gondii* e HUVEC *in vitro*. As culturas foram caracterizadas morfológicamente por microscopia óptica e eletrônica de transmissão e, quanto à interação parasito-célula hospedeira, os seguintes parâmetros foram avaliados: cinética da susceptibilidade da HUVEC frente à infecção; comparação da capacidade infectiva de taquizoítos obtidos de diferentes fontes e de duas cepas polares (ME-49 WT e GFP e RH) e, ainda, o destino intracelular do parasito. Culturas de HUVEC mantiveram as características morfológicas e funcionais preservadas como no sistema *in vivo*. As análises quantitativas mostraram que o *T. gondii* é capaz de invadir e se multiplicar ativamente nessas células, sendo que taquizoítos da cepa RH são mais infectivos do que taquizoítos da cepa ME-49 WT. Além disso, o método de obtenção dos parasitos pode influenciar na capacidade infectiva de taquizoítos provenientes do cultivo celular. As análises qualitativas realizadas por microscopia eletrônica de transmissão e citoquímica indicaram que a infecção de HUVEC gera ativação celular e altera a dinâmica de suas organelas em resposta à infecção, dentre elas, os corpúsculos de Weibel-Palade. Pela primeira vez, a conversão taquizoítos- bradizoítos e o estabelecimento da cistogênese em HUVEC foram demonstrados. O encistamento, nesta importante rota de infecção para o feto, pode atuar como repositório de parasitos ao longo da gestação, potencializando, por meio do rompimento dos cistos, re-infecções. Esse trabalho abre novas perspectivas para o estudo da interação de *T. gondii* e HUVEC *in vitro* e, com isso, potencialmente elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na transmissão congênita.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; Células endoteliais do cordão umbilical humano; Interação *T. gondii*- célula endotelial; Cistogênese; Corpúsculos de Weibel-Palade

ABSTRACT

Toxoplasma gondii, an obligate intracellular protozoan with cosmopolitan distribution is of great medical and veterinary relevance. Congenital toxoplasmosis represents one of the most serious consequences of the acute infection of the pregnant woman, which can lead to: vertical transmission (19%); abortion (9%) or malformation of the fetus (30%). During congenital transmission, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) are inserted in the main route of vertical transmission infection. However, this cellular model has been little explored in the context of experimental toxoplasmosis. Thus, the main objective of this dissertation was to analyze cellular aspects of the interaction of *T. gondii* and HUVEC *in vitro*. Cultures were morphologically characterized by optical and transmission electron microscopy and, in relation to the parasite- host cell interaction the following parameters were evaluated: kinetics of HUVEC susceptibility to infection; comparison of the infective capacity of tachyzoites obtained from different sources and from two polar strains (ME-49 WT and GFP and RH) and the intracellular fate of the parasite. Cultures of HUVEC maintained the morphological and functional characteristics preserved as *in vivo*. Quantitative analyzes showed that *T. gondii* is able to invade and multiply actively in these cells; wherein tachyzoites of the RH strain are more infective than tachyzoites of the ME-49 WT strain. Moreover, the method of obtaining the parasites may influence the infective capacity of tachyzoites from the cell culture. Qualitative analyzes performed by transmission electron microscopy and cytochemistry indicated that HUVEC infection generates cellular activation and changes the dynamics of its organelles in response to infection, among them Weibel-Palade corpuscles. For the first time, tachyzoites-bradyzoites conversion and establishment of cystogenesis in HUVEC was demonstrated. Cysts formation, in this important route of infection to the fetus, can act as a repository of parasites throughout gestation, potentializing, through the rupture of the cysts, re-infections. This work opens new perspectives for the study of the interaction of *T. gondii* and HUVEC *in vitro* and thus can elucidate the molecular mechanisms involved in congenital transmission.

Key words: *Toxoplasma gondii*; Human umbilical cord endothelial cells; Interaction *T. gondii*-endothelial cell; Cytogenesis; Weibel- Palade bodies

Lista de abreviaturas e siglas

CL - Corpúsculo lipídico

CWP - Corpúsculo de Weibel Palade

DMEM - Meio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's)

EGM-2 - "Endothelial Growth Protein"

GRA - Proteína do grânulo denso

HUVEC - Célula Endotelial de Veia Umbilical Humana (Human Umbilical Vein Endothelial Cell)

IL-8 - Interleucina 8

JA - Junções Aderentes

JG - Junções comunicantes do tipo GAP

JO - Junções de oclusão

MVP - Membrana do vacúolo parasitóforo

PBS - "Phosphate Buffer Saline"

RER - Retículo endoplasmático rugoso

RTV - Rede Tubulo vesicular

RhEGF - Fator de crescimento epidermal recombinante humano

RhFGF B - Fator de crescimento de Fibroblasto recombinante humano básico (Human Recombinant Fibroblast Growth Factor Basic)

ROP - Proteína da Rópria

RPM - Rotações por minuto

TC - Toxoplasmose Congênita

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular "Vascular endotelial growth fator"

VERO - Célula epitelial renal de macaco verde

VP - Vacúolo Parasitóforo

Lista de tabelas

Tabela 1 - Análise da porcentagem de vacúolos parasitóforos por célula infectada ao longo da cinética de infecção com taquizoítos da cepa ME49 de *T. gondii* obtidos de sobrenadante.

Tabela 2 - Análise da porcentagem de parasitos por vacúolo parasitóforo ao longo da cinética de infecção com taquizoítos da cepa ME49 de *T. gondii* obtidos de sobrenadante de culturas VERO.

Tabela 3 - Análise da porcentagem de vacúolos parasitóforos por célula infectada ao longo da cinética de infecção com taquizoítos da cepa ME49 de *T. gondii* obtidos pela lise de culturas VERO.

Tabela 4 - Análise da porcentagem de parasitos por vacúolo parasitóforo ao longo da cinética de infecção com taquizoítos da cepa ME49 de *T. gondii* obtidos pela lise de culturas VERO

Tabela 5 - Análise da porcentagem de vacúolos parasitóforos por célula infectada ao longo da cinética de infecção com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* obtidos de sobrenadante.

Tabela 6 - Análise da porcentagem de parasitos por vacúolo parasitóforo ao longo da cinética de infecção com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* obtidos de sobrenadante.

Tabela 7 - Análise da porcentagem de vacúolos parasitóforos por célula infectada ao longo da cinética de infecção com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* obtidos pela lise das culturas VERO

Tabela 8 - Análise da porcentagem de parasitos por vacúolo parasitóforo ao longo da cinética de infecção com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* obtidos pela lise das culturas VERO.

Lista de figuras

Figura 1.1 - Esquema do ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* nos hospedeiros intermediários e definitivos

Figura 1.2 - Ilustração da anatomia de uma artéria saudável mostrando as camadas que a revestem, com eritrócitos no seu interior

Figura 1.3 - Esquema representativo das funções exercidas pelas células endoteliais

Figura 1.4 - Esquema simplificado das etapas de síntese e armazenamento do fator de von Willebrand e maturação dos corpúsculos de WP.

Figura 1.5 - Ultraestrutura dos corpúsculos de Weibel-Palade

Figura 5.1 - Cultivo primário de células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVEC):

Figura 5.2 - HUVEC no período de 48 h a 6 dias de cultivo

Figura 5.3 - Corpúsculos de Weibel-Palade em HUVEC

Figura 5.4 - Caracterização ultraestrutural de culturas HUVEC por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Figura 5.5 - Aspectos morfológicos revelados pela ultraestrutura

Figura 5.6 - Ultraestrutura dos corpúsculos de Weibel-Palade

Figura 5.7 - Aspectos da fisiologia dos corpúsculos de Weibel Palade em HUVEC

Figura 5.8 - Vesícula sugestivas de CWP revestida de Clatrina

Figura 5.9 - Análise da porcentagem de HUVEC infectadas ao longo de 24, 48 e 72 h por taquizoítos da cepa ME-49 de *T. gondii*.

Figura 5.10 - Aspectos da infecção de taquizoítos da cepa ME-49 de *T. gondii* recolhidos de sobrenadante das culturas VERO, em culturas primárias de HUVEC.

Figura 5.11 - Aspectos da infecção de taquizoítos da cepa ME-49 de *T. gondii* obtidos por lise das culturas VERO, em culturas primárias de HUVEC.

Figura 5.12 - Análise da porcentagem de HUVEC infectadas ao longo de 24, 48 e 72 h por taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*.

Figura 5.13 - Aspectos de infecção de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* obtidos de sobrenadante em culturas primárias de HUVEC.

Figura 5.14 - Cinética de infecção de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* obtidos por lise em culturas primárias de HUVEC.

Figura 5.15 - Aspectos ultraestruturais da interação de *T. gondii* e HUVEC.

Figura 5.16 - Associação de organelas à membrana do vacúolo parasitóforo de *T. gondii* em HUVEC.

Figura 5.17 - Aspectos ultraestruturais da interação de *T. gondii* e HUVEC.

Figura 5.18 - Aspectos ultraestruturais da interação de *T. gondii* e CWP em HUVEC.

Figura 5.19 - Aspectos ultraestruturais da interação de *T. gondii* e perfis de Golgi em HUVEC.

Figura 5.20 - Aspectos ultraestruturais da divisão celular de *T. gondii* em HUVEC.

Figura 5.21 - Aspectos ultraestruturais da interação de *T. gondii* e HUVEC com aumento da RTV e matriz vacuolar.

Figura 5.22 - Aspectos ultraestruturais da interação de *T. gondii* e HUVEC.

Figura 5.23 - Aspectos ultraestruturais da conversão de taquizoítos em bradizoítos de *T. gondii* em HUVEC.

Figura 5.24 - Grânulos de glicogênio contidos no interior de VP contendo taquizoítos e bradizoítos e manutenção das áreas juncionais em HUVEC infectada por *T. gondii*.

Figura 5.25 - Associação de organelas ao vacúolo parasitóforo durante o processo de conversão de taquizoítos em bradizoítos de *T. gondii* em HUVEC.

Figura 5.26 - Processo de conversão de taquizoítos em bradizoítos de *T. gondii* em HUVEC.

Figura 5.27 - Bradizoítos de *T. gondii* encontrados no meio extracelular.

Figura 5.28 - Cistos de *T. gondii* da cepa ME49 em HUVEC.

Figura 5.29 - Cistos de *T. gondii* da cepa ME49 em HUVEC.

Figura 5.30 - Cistos de *T. gondii* da cepa ME49 em HUVEC.

Figura 5.31 - Cistos de *T. gondii* da cepa ME49 em HUVEC.

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract	vii
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. <i>Toxoplasma gondii</i>.....	1
1.1. Aspectos gerais	2
1.2. Formas infectivas.....	2
1.3. Ciclo de vida	2
1.4 Biologia de <i>Toxoplasma gondii</i>.....	3
1.5. Ciclo intracelular.....	5
1.5.1 Ciclo lítico.....	5
1.5.2 Cistogênese.....	7
1.6 Cepas de <i>T. gondii</i>.....	8
1.7. Toxoplasmose congênita (TC).....	9
1.8. Tecido endotelial.....	12
1.8.1. Características morfológicas e funcionais das células endoteliais.....	13
1.8.1.1. Transportes Transcelular e Paracelular	14
1.8.1.2. Junções intercelulares	15
1.8.1.3. Corpúsculos de Weibel-Palade	16
1.8.1.4. Resposta do endotélio à ativação	20
1.8.2 Cultivo primário de células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVEC)	20
1.8.3 Célula endotelial e <i>T. gondii</i>	22
II. JUSTIFICATIVA.....	24
III. OBJETIVOS.....	25
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Cultura primária de células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVEC).....	26
4.2 Cultura da linhagem celular epitelial renal (Vero).....	26
4.3 Obtenção de parasitos.....	27

4.3.1 Taquizoítos recolhidos do sobrenadante de células Vero.....	27
4.3.2. Taquizoítos das cepas RH e ME49 provenientes da lise mecânica de culturas vero.....	28
4.4. Ensaio de infectividade e análise do destino intracelular de taquizoítos frente a célula endotelial da veia do cordão umbilical humano (HUVEC).....	29
4.5. Processamento das culturas HUVEC para análise de microscopia de campo claro.....	30
4.6. Quantificação de infectividade de <i>T. gondii</i> em células HUVEC.....	30
4.7. Imunofluorescência para revelação dos corpúsculos de Weibel-Palade em HUVEC e marcação de cistos de <i>T. gondii</i> por imunocitoquímica.....	31
4.8. Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	31
4.9 Animais e aspectos éticos.....	32
V. Resultados	33
5.1. Caracterização morfológica de HUVEC.....	33
5.2. Análise da infectividade de taquizoítos em HUVEC das cepas ME-49 e RH de <i>T. gondii</i> obtidos de células Vero.....	44
5.2.1. Análise comparativa da interação de taquizoítos de <i>T. gondii</i> da cepa avirulenta ME-49 frente a culturas HUVEC obtidos do sobrenadante e pela lise mecânica de células VERO.....	44
5.2.2. Análise comparativa da interação de taquizoítos de <i>T. gondii</i> da cepa virulenta RH de frente a culturas HUVEC obtidos do sobrenadante e pela lise mecânica células VERO.	52
5.3. Aspectos ultraestruturais da interação de <i>T. gondii</i> e HUVEC.....	68

5.4. Cistogênese de <i>T. gondii</i> em HUVEC	84
VI. DISCUSSÃO.....	89
VII. CONCLUSÕES.....	106
VIII. REFERÊNCIAS.....	107

I. INTRODUÇÃO

1. *Toxoplasma gondii*

1.1 ASPECTOS GERAIS

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa e subclasse Coccidiasina (DUBEY e SPEER, 1997). A primeira descrição desse protozoário ocorreu quase que simultaneamente em 1908, por Splendore, no Brasil, e Nicolle e Manceaux, na Tunísia (SPLENDORE, 1908; NICOLLE e MANCEAUX, 1908).

É um dos parasitos com maior importância médica e veterinária, capaz infectar todas as células nucleadas de uma ampla gama de hospedeiros, incluindo o homem. Atualmente, é estimado que cerca de um terço da população mundial esteja infectada pelo *T. gondii*, agente causador da Toxoplasmose, considerada uma das zoonoses mais frequentes do mundo (MONTROYA *et al.*, 2004; VIDAL *et al.*, 2005).

A infecção pelo *T. gondii* normalmente permanece latente e é assintomática em indivíduos imunocompetentes. No entanto, alguns estudos realizados nos últimos anos apontam a possível relação da infecção crônica e doenças psiquiátricas, como a esquizofrenia e doenças neurológicas, como epilepsia e enxaqueca (YOLKEN *et al.*, 2009; WEBSTER *et al.*, 2013). A gravidade da infecção é aumentada em indivíduos com o sistema imunológico comprometido, como na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (“AIDS”), uso de imunossupressores administrados em pacientes transplantados, nas doenças autoimunes e em alguns tipos de câncer. Nesses indivíduos, a infecção pelo parasito pode levar o hospedeiro ao óbito (JACKSON e HUTCHISON, 1989; TENTER *et al.*, 2000).

O carnivorismo representa a principal via de infecção dos hospedeiros, por meio do consumo de carne e vísceras cruas ou malcozidas, contendo cistos teciduais (DUBEY *et al.*, 1972; DUBEY, 2004). Outra importante via de transmissão é a vertical, quando taquizoítos circulantes no sangue da mãe ultrapassam a barreira placentária e infectam o feto (DUBEY, 1991). Embora

menos frequentes, a infecção pode ocorrer por meio da transfusão de sangue e transplante de órgãos.

1.2 FORMAS INFECTIVAS

O parasito apresenta três formas infectivas em seu ciclo de vida: a) **Taquizoítas** - formas presentes na fase aguda da doença e que são capazes de ultrapassar as principais barreiras biológicas, como a placenta e a barreira hemato-encefálica (HARKER *et al.*, 2015). Ao atingir a corrente sanguínea e os vasos linfáticos, podem alcançar qualquer tecido, invadindo as células e se multiplicando rapidamente no interior de vacúolos parasitóforos. Ao fim da multiplicação, esses taquizoítos evadem da célula em um processo chamado ciclo lítico e infectam novas células (BLACK e BOOTHROYD, 2000). b) **Bradizoítas** - possuem metabolismo e crescimento mais lento, se comparados às formas taquizoítas. Os bradizoítos secretam glicoproteínas que formam a parede cística protegendo os parasitos da resposta imune do hospedeiro, no interior dos cistos teciduais, estabelecendo o processo da cistogênese. A formação desses cistos ocorre preferencialmente em células musculares e no sistema nervoso central. A divisão celular de taquizoítos e bradizoítos se dá por endodiogenia e de forma assincrônica (DZIERSZINSKI *et al.*, 2004); c) **Esporozoítas** - encontrados no interior de oocistos esporulados, resultantes da reprodução sexual do parasito, que ocorre no intestino do hospedeiro definitivo, os felídeos. Extremamente resistentes às condições ambientais, podem permanecer infectivos por muitos anos (DUBEY *et al.*, 1998).

1.3 CICLO DE VIDA

O *T. gondii* possui ciclo biológico heteróxico, que compreende duas fases: a fase sexuada e a fase assexuada. A fase sexuada se estabelece exclusivamente nas células epiteliais do intestino de felídeos, o hospedeiro definitivo do parasito (Fig. 1). A infecção dos felídeos se dá por meio da predação de pequenos animais cronicamente infectados ou por ingestão de oocistos dispersos no meio ambiente. O ciclo sexuado culmina com a liberação de oocistos pelas fezes desses animais.

Uma vez no meio ambiente, estes oocistos contaminam a água, ar e solo, servindo de fonte de infecção para novos hospedeiros (definitivos e intermediários) (DUBEY, 2004).

A fase assexuada ocorre nos hospedeiros definitivos e intermediários. Após ingerir carne contendo cistos teciduais ou água e outros alimentos contaminados com oocistos presentes no ambiente, a parede cística ou a parede do oocisto é rompida pela ação de enzimas digestivas e as formas bradizoítas e esporozoítas, respectivamente, invadem as células da mucosa intestinal. Após essa invasão ocorre a conversão dessas formas em taquizoítos, o que desencadeia a rápida multiplicação do parasito e expansão da infecção. Após esse processo, a depender da cepa do parasito, as formas taquizoítas podem se converter em formas bradizoítas e formar cistos teciduais, onde permanecem por toda a vida do hospedeiro (HILL e DUBEY, 2002).

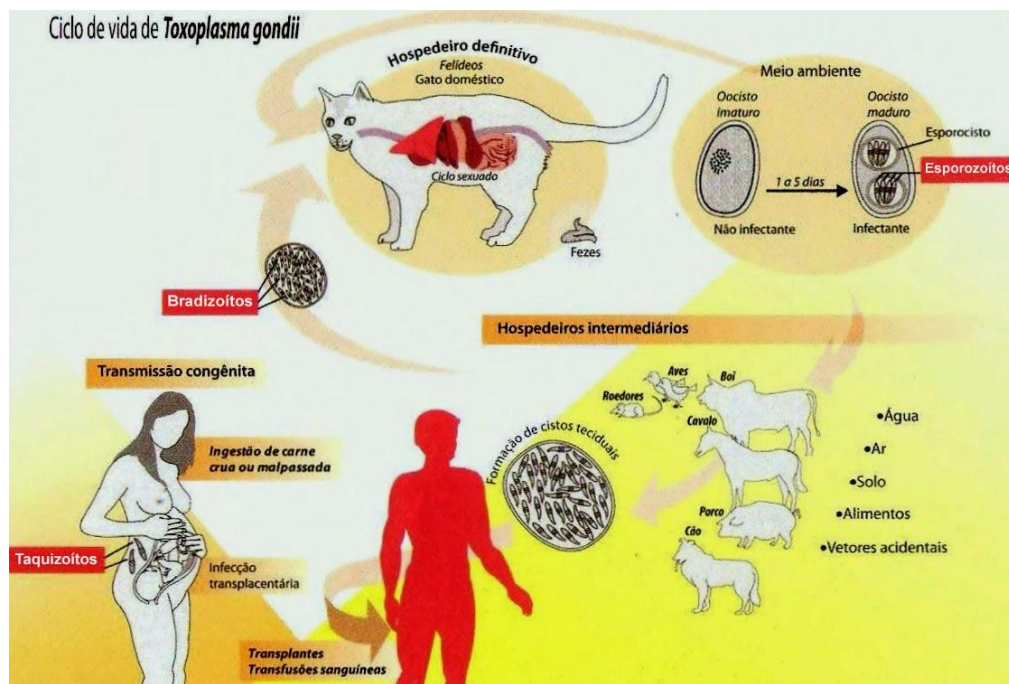


Figura 1.1 - Esquema do ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* nos hospedeiros intermediários e definitivos. Fonte: MOURA *et al.* (2009)

1.4 - BIOLOGIA DE *Toxoplasma gondii*

O *T. gondii* é alongado e em forma de vírgula medindo aproximadamente 1,5-2 μm de largura e de 6-8 μm de comprimento. Possui as principais organelas comuns às células eucarióticas, dentre elas: núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndria e Golgi. Na região anterior ou apical do corpo do parasito está localizado o complexo apical, formado pelas seguintes estruturas: anel polar, anéis pré-conoidais, microtúbulos intraconoidais, conóide e pelas organelas secretórias, as róptrias e micronemas (revisto em DE SOUZA *et al.*, 2010; PAREDES-SANTOS *et al.*, 2012). As organelas secretoras são fundamentais durante o processo de adesão, invasão e permanência do parasito no interior da célula hospedeira e apresentam as seguintes características:

Micronemas - organelas em formato de bastão de aproximadamente 200 nm localizadas logo abaixo do conóide. Possuem secreção controlada pelo influxo intracelular de cálcio e secretam um complexo de proteínas adesivas (MIC) responsáveis pela movimentação e adesão do parasito à célula hospedeira (CARRUTHERS e TOMLEY, 2008). Essas proteínas são liberadas logo no início do processo de reconhecimento celular e invasão do parasito (HUYNH e CARRUTHERS, 2006; BUGULISKIS *et al.*, 2010). Além disso, secretam proteínas perforina-“like” importantes para o egresso do taquizoítas (KAFSACK *et al.*, 2009). Os ensaios *in vitro* demonstram a atuação dessas proteínas durante a transmigração do parasito nos tecidos, por meio da sua interação com moléculas de adesão presentes na superfície da célula hospedeira (BARRAGAN *et al.*, 2005).

Róptrias - organelas alongadas, semelhantes à esponja, de 200 nm de largura por 1 μm de comprimento, ricas em lipídeos e com duas porções: a região de bulbo e a região de pescoço, que atinge o interior do conóide. Seu número é variável: 8 a 10 organelas por parasito (DUBEY *et al.*, 1998). As proteínas compartimentalizadas no bulbo, as ROP, são responsáveis pela formação da junção móvel, e as do pescoço, as RON, compõem a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) (BOOTHROYD e DUBREMETZ, 2008; BESTEIRO *et al.*, 2009; PAREDES-SANTOS *et al.*, 2011; BECK *et al.*, 2014). Num processo em cascata, as proteínas presentes nas róptrias são liberadas após a secreção das MIC (DE SOUZA *et al.*, 2010). Elas também participam como moduladoras do

sistema imunológico e reguladoras da conversão de taquizoítos em bradizoítos (LEROUX *et al.*, 2015; FOX *et al.*, 2016).

Grânulos densos - organelas esféricas, eletrondensas, de aproximadamente 0.2 μm de diâmetro que se localizam por todo o corpo do parasito (DUBEY *et al.*, 1998). As proteínas dos grânulos densos, as GRA, são secretadas após as MIC e as ROP, ainda durante a formação do vacúolo parasitóforo. Estudos apontam que elas não estão apenas solúveis no interior do vacúolo ou associadas à membrana do vacúolo, mas também são secretadas no meio citoplasmático e modificam as vias de sinalização da célula hospedeira, garantindo, assim, a manutenção da infecção (ROSOWSKI *et al.*, 2011). Mais de 20 tipos de GRA têm sido descritos (ROMMEREIM *et al.*, 2016).

1.5 CICLO INTRACELULAR

1.5.1 Ciclo lítico

A infecção das células hospedeiras pelo *T. gondii* envolve a invasão por penetração ativa do parasito, que proporciona o seu não reconhecimento frente à resposta imune do hospedeiro, induzindo ao bloqueio da fusão fagolisossomal (JONES *et al.*, 1972; MORDUE e SIBLEY, 1997; YAMAMOTO e TAKEDA, 2012). O processo de reconhecimento celular parasito-célula hospedeira tem início por meio do deslizamento do parasito sobre a superfície celular, via proteínas de membrana do parasito, as SAGs (“surface antigens”) e as SRSs (“SAG related surface antigens”) estabelecendo-se, então, a adesão entre as duas células (BLADER *et al.*, 2009). Associado a esse processo, a secreção de proteínas de organelas localizadas na região apical do parasito participa também da adesão, invasão e manutenção do parasito no interior da célula. Todo o processo é desencadeado em cascata e os micronemas iniciam essa interação por meio da secreção de proteínas adesivas, como: AMA1, MICs e M2AP, que interagem com componentes de superfície da célula hospedeira. Outras proteínas com domínio transmembranar fazem parte do glideosoma, estrutura transitória responsável pelo deslizamento do parasito, que se conecta entre a célula hospedeira e a

maquinaria interna do parasito (SOLDATI *et al.*, 2010; TARDIEUX E BAUM, 2016). O efeito cascata dessa interação se estabelece por meio das proteínas secretadas pelas róptrias com participação ativa na invasão (RON-2, RON-4, RON-5 e RON-8), formando uma estrutura também transitória, com constrição em torno do corpo do parasito, a junção móvel, que funciona como uma “peneira”, selecionando os componentes da membrana do hospedeiro que irão integrar a membrana do vacúolo parasitóforo (ALEXANDER *et al.*, 2005; BESTEIRO *et al.*, 2011). O processo de invasão envolve ainda, a membrana plasmática da célula hospedeira: invaginação e formação do vacúolo parasitóforo, no qual o parasito ficará albergado e em ativa multiplicação (SHEN e SIBLEY, 2012). Outra via alternativa de acesso do parasito ao interior da célula hospedeira é por fagocitose, confirmado por meio de ensaios com dinasoro, um inibidor da via endocítica (JONES *et al.*, 1972; MORISAKI *et al.*, 1995; GUIMARÃES *et al.*, 2008; KIRCHHAUSEN *et al.*, 2008; CALDAS *et al.*, 2009).

O parasito no interior da célula, localizado no vacúolo parasitóforo, dá início ao processo de secreção de proteínas das róptrias (ROP) que são liberadas em sequência à secreção das RON, passando a integrar a composição da MVP e/ou migram para o interior da célula hospedeira e/ou para o lúmen do VP em formação (BOOTHROYD e DUBREMETZ, 2008). Associado a esse processo, proteínas dos grânulos densos são secretadas durante e após a invasão do parasito, permanecendo solúveis no lúmen do VP ou tornam-se associadas à MVP ou à rede túbulo-vesicular (RTV) dentro do VP (MERCIER *et al.*, 2002; MAGNO *et al.*, 2005; VOMMARO *et al.*, 2014). Todo esse processo de cunho molecular modifica o ambiente no interior do VP, o que garante a sobrevivência e replicação do parasito e promove o transporte de carboidratos, lipídeos, íons, ATP e aminoácidos (revisto em PENG *et al.*, 2011). Durante essa sequência de interações moleculares, em particular da secreção de proteínas das róptrias, o *T. gondii* promove o recrutamento de organelas da célula hospedeira, tais como, retículo endoplasmático, mitocôndrias e corpos lipídicos (SINAI *et al.*, 1997, 2001; GOMES *et al.*, 2014; MOTA *et al.*, 2014). Tem sido bem estabelecido que este recrutamento favorece a maquinaria energética da célula hospedeira, garantindo o desenvolvimento do parasito intracelular e sua manutenção durante a fase crônica da infecção (SINAI e JOINER, 1997; LALIBERTÉ e CARRUTHERS, 2008; revisto em PENG *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2014).

Os mecanismos utilizados pelo parasito para interagir com a célula parecem ser multifatoriais, pois o parasito é capaz de infectar todas as células nucleadas e, por vezes, até invadir o núcleo da célula hospedeira (DUBEY, 2004; BARBOSA *et al.*, 2005). No interior do VP, o parasito se divide sucessivamente por endodiogenia, que a depender do perfil genotípico da cepa, em torno de 48 h após a entrada, ocorre o egresso do parasito da célula hospedeira. Durante a replicação, há produção de ácido abscísico e aumento do influxo de cálcio intracelular, facilitando a saída do parasito da célula hospedeira pelo aumento da permeabilidade da MVP, devido à secreção e inserção de proteínas dos micronemas semelhantes às porinas (KAFSACK *et al.*, 2009). Essas porinas também atuarão na membrana da célula hospedeira, possibilitando, assim, o escape do parasito para o meio extracelular, com a invasão de novas células, reiniciando o ciclo lítico (CALDAS *et al.*, 2010; BLACKMAN e CARRUTHERS, 2013).

1.5.2 Cistogênese

A diferenciação celular é uma etapa crítica para organismos unicelulares e multicelulares, incluindo parasitos protozoários como *T. gondii*, sendo crucial para garantir sua sobrevivência, multiplicação e transmissão entre os hospedeiros (DZIERSSZINSKI, 2004). A cistogênese é um processo decorrente da diferenciação de formas taquizoítas em bradizoítas, garantindo o estabelecimento da infecção crônica com a manutenção do parasitismo durante toda a vida do hospedeiro (FRENKEL, 1973; WEISS e KIM, 2000; SCHLÜTER *et al.*, 2014). O destino intracelular do parasito é dependente da sinalização de cálcio mediada pelo ácido abscísico, um hormônio vegetal que é fundamental para seu desenvolvimento e sua replicação, capaz de direcionar para o ciclo lítico ou a cistogênese. Nagamune e colaboradores (2008), durante ensaios de inibição da produção de ácido abscísico com fluridone, um herbicida, demonstraram que a ausência deste ácido inibe a saída dos parasitos da célula hospedeira, favorecendo a diferenciação de taquizoítos para bradizoítos e a formação de cistos.

O entendimento da dinâmica dos processos de conversão e interconversão de taquizoítos - bradizoítos tem concentrado a atenção em elucidar as lacunas no

conhecimento das interações moleculares participantes desse processo (WHITE *et al.*, 2014). Essa diferenciação é modulada pela regulação positiva e negativa de vários genes específicos dos estágios infectivos (BEHNKE *et al.*, 2008; NAGULESWARAN *et al.*, 2010) que codificam várias proteínas de superfície, proteínas da parede cística, proteínas secretoras/excretoras, enzimas (em especial da via glicolítica), proteínas de choque térmico, fatores de transcrição e outros (MANGER *et al.*, 1998; RADKE *et al.*, 2005; NAGULESWARAN *et al.*, 2010).

Os cistos são encontrados com maior frequência em cepas avirulentas de *T. gondii* do tipo II (VEG, ME49, Beverley, Prugniaud e NTE) (LINDSAY *et al.*, 1993; McHUGH *et al.*, 1993; De MUNO *et al.*, 2014) e em maior número quando comparadas às cepas virulentas do tipo I (cepa RH e BK) (BOHNE *et al.*, 1994, 1999). Alguns estudos sobre estágio de conversão taqui↔bradi propõem que a formação de cistos teciduais não está associada ao tipo celular (LINDSAY *et al.*, 1991). Essa hipótese é apoiada por ensaios *in vitro* que utilizam a indução da interconversão, empregando diferentes estratégias experimentais, tais como, alteração do pH do meio ou variação da temperatura (SOËTE *et al.*, 1994), citocinas pró-inflamatórias ou inibidores de organelas como a mitocôndria (BOHNE *et al.*, 1994), e deleção de nutrientes do meio (FOX *et al.*, 2004). SOËTE e colaboradores (1994) observaram a expressão de proteínas específicas de bradizoítos (BAG-1) em culturas celulares das linhagens Vero e HFF infectadas com *T. gondii* (cepa RH), e formação de estruturas císticas, quando submetidas a estresse físico e metabólico.

Dados de FERREIRA-DA-SILVA *et al.* (2009a, b) sugerem que o microambiente celular tem papel fundamental para determinar a conversão do *T. gondii*, uma vez que em culturas primárias de células musculares esqueléticas infectadas com taquizoítos de cepa virulenta tipo I (RH), a diferenciação de taquizoíto para bradizoíto ocorre espontaneamente, isto é, sem qualquer interferência exógena que induza a interconversão. Além disso, a produção de cistos de *T. gondii* em linhagens musculares é mais eficaz do que as observadas em culturas de fibroblastos. Esse conjunto de dados corrobora a hipótese de que o destino intracelular do parasito tem como um dos fatores indutores da cistogênese, o tipo celular no qual se estabelece a infecção (FERREIRA-DA-

SILVA *et al.*, 2008; 2009 a, b). Os estudos da cistogênese de *T. gondii* foram impulsionados com a descoberta de proteínas específicas do estágio evolutivo do parasito, que atuam como antígenos, e possibilitaram a produção de anticorpos, favorecendo o entendimento do processo de diferenciação *in vitro* do parasito (BOHNE *et al.*, 1993; LINDSAY *et al.*, 1993; McHUGH *et al.*, 1993; SOETE *et al.*, 1993; BOHNE *et al.*, 1994; GROSS e BOHNE, 1994; SOETE *et al.*, 1994; GROSS *et al.*, 1996; SAHM *et al.*, 1997; GUIMARÃES *et al.*, 2008; FERREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2008, 2009a; De MUNO *et al.*, 2014; GARCIA, 2016).

1.6 - CEPAS DE *Toxoplasma gondii*

A presença de *Toxoplasma* em todos os continentes do planeta se deve a sua ampla gama de hospedeiros intermediários e sua variabilidade genética. As cepas de toxoplasma são classificadas de acordo com a virulência e mortalidade em modelo murino. Desta forma, as cepas isoladas na América do Norte e Europa foram classificadas em três linhagens clonais, tipos I, II e III (HOWE *et al.*, 1995). As cepas do tipo I são as mais virulentas e levam à maior taxa de mortalidade em modelos murinos infectados. As cepas do tipo II são classificadas como avirulentas, pois a infecção em camundongos geralmente causa baixa mortalidade e tendem a evoluir para a fase crônica da doença. As cepas do tipo II são as mais comumente encontradas na doença em humanos, embora as cepas do tipo I tenham sido demonstradas como mais associadas à forma ocular e congênita da Toxoplasmose humana (YANG *et al.*, 2003). As cepas do tipo III, ou cepas híbridas, são derivadas de cepas ancestrais dos tipos I e II, apresentando virulência intermediária.

Embora haja a classificação em três principais tipos, são descritas cepas atípicas formadas durante o ciclo sexuado do parasito. É necessário que o mesmo hospedeiro definitivo esteja infectado por parasitos de duas cepas distintas para que haja o cruzamento genético. A cepa, então, é classificada como sendo atípica quando a mesma não possui os marcadores genéticos já conhecidos para a classificação em um dos três tipos dominantes. No Brasil há maior circulação de cepas atípicas, entre elas virulentas, avirulentas e de virulência intermediária (KHAN *et al.*, 2006; FRAZÃO-TEIXEIRA *et al.*, 2011).

1.7 TOXOPLASMOSE CONGÊNITA (TC)

A toxoplasmose congênita pode ocorrer quando uma mulher adquire infecção por *T. gondii* pela primeira vez durante a gravidez ou, mais raramente, pouco antes da concepção, representando uma das consequências mais graves da infecção pelo toxoplasma (revisto em POMARES e MONTOYA, 2016). Nessas condições, as chances do parasito presente no sangue da mãe atingir o feto atravessando a barreira hemato-placentária (transmissão vertical) chegam a 25%, independente de tratamento da mãe (CORTINA-BORJA *et al.*, 2010; HOTOP *et al.*, 2012). O risco geral de transmissão em mães que foram tratadas durante a gestação é de cerca de 30%. No entanto, esse dado varia consideravelmente de acordo com a idade gestacional em que a mãe tratada adquiriu a infecção, de 15% na 13ª semana, 44% na 26ª semana e 71% na 36ª semana (BESSIÈRES *et al.*, 2001; SYROCOT *et al.*, 2007). Um importante estudo a cerca das taxas de transmissão vertical em seres humanos, utilizando tecido do cordão umbilical obtidos após o nascimento, detectou, pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), taxas de transmissão de 19,8% (HIDE *et al.*, 2007; HALONEN *et al.*, 2013). Além disso, cerca de 85% dos fetos não tratados apresentam algum sinal da doença durante a infância e a vida adulta, em sua maioria atraso no desenvolvimento e alterações na retina (KOPPE *et al.*, 1986). Menos freqüentemente, a TC também pode ocorrer quando a infecção da mulher se dá anterior à gestação e em decorrência de imunossupressão: a infecção até então latente, sofre reativação (revisto em LOPEZ *et al.*, 2003; POMARES e MONTOYA, 2016). A América do Sul possui a maior incidência de TC, além de ser o local no qual ocorre a circulação dos genótipos mais patogênicos (TORGERSON e MASTROLACOVO, 2007). No Brasil, a porcentagem de mulheres soropositivas para *T. gondii* é de cerca 50 a 80% (DUBEY *et al.*, 2012).

O aumento da produção de hormônios durante a gestação causa um desequilíbrio do sistema imunológico, tornando a resposta inflamatória menos eficiente, gerando maior risco de expansão da infecção e acometimento do feto (ROBERTS *et al.*, 2011). As consequências da infecção fetal podem ser graves, tais como, importante influência no desenvolvimento do sistema nervoso central

do feto, levando a sérias patologias neurológicas, tais como: hidrocefalia e distúrbios mentais, retardo no desenvolvimento fetal, anomalias cardiovasculares, alterações auditivas e oftalmológicas e, em último grau, o aborto espontâneo (DUNN *et al.*, 1999; GILBERT e GRAS, 2003; GRAS *et al.*, 2005; McLEOD *et al.*, 2006; REMINGTON *et al.*, 2006; Oz e TOBIN, 2012). A severidade dos danos depende do período da gestação no qual ocorreu a infecção, se foi no primeiro trimestre estes apresentam consequências mais graves (DUNN *et al.*, 1999; REMINGTON *et al.*, 2006). As manifestações clínicas oftalmológicas, como a retinocoroidite, representam uma das patologias mais incidentes causadas pela Toxoplasmose congênita (até 95%) (SING, 2016) e o índice de prevalência parece ser independente do período gestacional no qual ocorreu a infecção (THIÉBAUT *et al.*, 2007). Porém, na forma bilateral, tem maior prevalência entre indivíduos infectados congenitamente quando comparados a indivíduos infectados por outras vias (MC AULEY, 2014).

O diagnóstico da infecção materna é realizado por sorologia ainda no primeiro trimestre. No caso da gestante ser positiva para anticorpos imunoglobinas do tipo IgM, a gestante é diagnosticada com infecção aguda e inicia o tratamento com espiramicina (BÁRTHOLO *et al.*, 2015; SING, 2016). A pesquisa para anticorpos imunoglobulinas do tipo IgG indica que a mulher já entrou em contato com o parasito anteriormente e há possibilidade de infecção latente. Para investigar em que momento a mãe entrou em contato com o parasito, pode ser aplicado o teste de avidéz de IgG que indica se ela adquiriu a infecção há mais de 4 meses (LAPPALANEINE, 1993; SING, 2016). A confirmação do contato do parasito com o feto é feita por testes moleculares que contam com 98% de sensibilidade e 100% de especificidade (RT-PCR) (TEIXEIRA *et al.*, 2013). A negatividade para IgM e IgG, preconiza-se o acompanhamento e repetição do teste sorológico durante toda a rotina de exames do pré-natal até o fim da gestação (PAQUET *et al.*, 2013; BÁRTHOLO *et al.*, 2015; OZ, 2016). Apesar da espiramicina agir na placenta, caso o parasito já tenha ultrapassado a barreira transplacentária, a espiramicina não pode reverter o dano (OZ, 2016; SING, 2016).

Os mecanismos envolvidos na disseminação do parasito para o feto ainda não estão bem esclarecidos. No entanto, os dados epidemiológicos que apontam

a variação do risco de taxa de infecção fetal, de acordo com a idade gestacional, são corroborados por um estudo *in vitro*, no qual foi demonstrado que explantes de células da placenta humana do terceiro trimestre de gestação (36 a 40 semanas) são mais permissivas à infecção quando comparado às células no primeiro trimestre de gestação (9 a 12 semanas) (OLIVEIRA GOMES *et al.*, 2011). Esse dado pode ser atribuído a uma série de alterações fenotípicas que ocorre durante o desenvolvimento da placenta, tais como, a variação da expressão de receptores e a liberação de citocinas secretadas que disparam um processo de resposta, na tentativa de inibir a expansão da infecção (OLIVEIRA GOMES *et al.*, 2011; WUJCICKA *et al.*, 2014; CASTILLO *et al.*, 2017). Sendo assim, a placenta desempenha uma importante função como barreira protetora contra infecções.

Poucos patógenos adquirem a capacidade de infectar a placenta e expandir a infecção para o feto, dentre eles está o *T. gondii* (BIERLY *et al.*, 2008; ROBBINS *et al.*, 2012). Ensaio *in vivo*, utilizando camundongos, mostram que a transmissão ocorre primeiramente pela infecção de células uterinas maternas, localizadas na região de nidação do embrião, que são células presentes na interface entre o sangue da mãe e do feto (ABASSI *et al.*, 2003). A migração transplacentária parece ocorrer de várias formas e diversos trabalhos exploram a infecção de células do sistema imune como “cavalos de Tróia” (PFAFF *et al.*, 2005; LAMBERT *et al.*, 2006; ROBBINS *et al.*, 2012). Estas células, quando infectadas, teriam maior capacidade de migração, sendo atraídas para a placenta. A lise dessas células permite a liberação dos parasitos, que uma vez no meio extracelular, infectam as células da placenta (LAMBERT *et al.*, 2006; ROBBINS *et al.*, 2012). Uma vez que o parasito estabelece a infecção nas células da placenta, este pode infectar as células do endotélio da veia do cordão umbilical, que é a via pela qual o parasito atinge a circulação fetal (SHIONO *et al.*, 2007).

1.8 TECIDO ENDOTELIAL

O endotélio é composto por uma monocamada de células endoteliais, constituindo o tecido epitelial pavimentoso simples, que reveste a face interna de vasos sanguíneos (SUMPIO *et al.*, 2002) (Fig. 2). Dada a sua localização, as células endoteliais atuam na interface da corrente sanguínea e os tecidos

subjacentes, desempenhando inúmeras funções, tais como: estimulação da angiogênese, regulação do tônus vascular e pressão arterial (Fig. 3). Em casos de injúria tecidual, participam da reparação do dano por meio da liberação de fatores de coagulação, atuando na área lesada (WU *et al.*, 1996; WU e THIAGARAJAN, 1996; DIMMELER *et al.*, 1998; AIRD, 2007a).

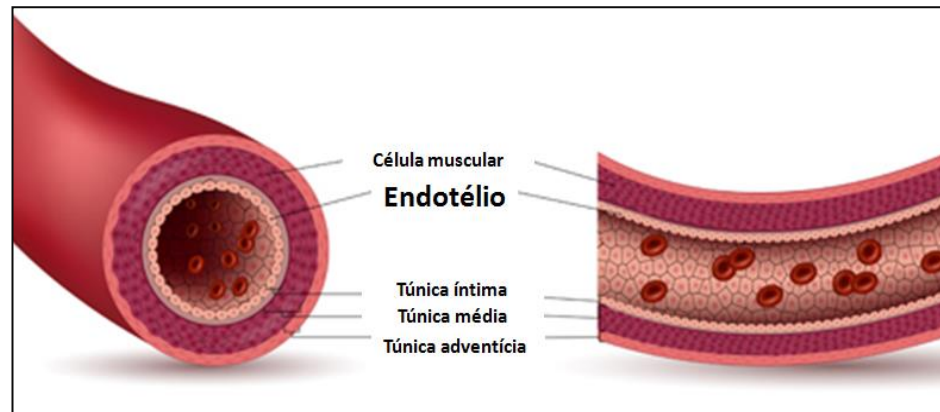


Figura 1.2 – Ilustração da anatomia de uma artéria saudável, com eritrócitos no seu interior, mostrando as camadas que a revestem. Imagem traduzida de <http://northamericanheart.com/increased-endothelium-expansion/> Data: 10/08/2017

O endotélio, devido ao seu papel secretor e sinalizador de inúmeros processos que garantem a hemostasia do sistema vascular (GOLAN *et al.*, 2007; Page & Liles, 2013), foi classificado nas últimas décadas como um tecido endócrino, com relevante atividade metabólica (FÉLÉTOU *et al.*, 2011; RAJENDRAN *et al.*, 2013). Além disso, receptores presentes na membrana plasmática das células endoteliais controlam o tráfego de proteínas, lipídeos e hormônios (CINES *et al.*, 1998; GALLEY e WEBSTER, 2004).

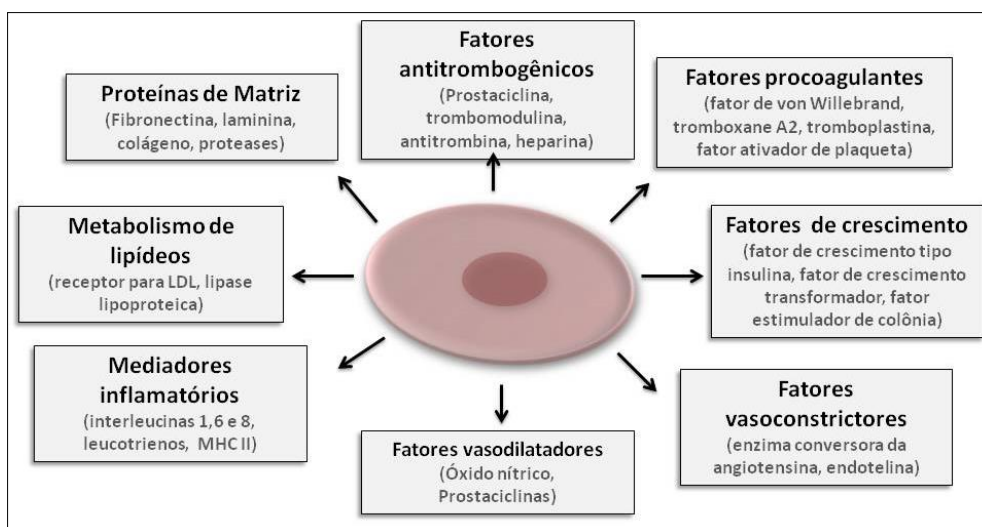


Figura 1.3 - Esquema representativo das funções exercidas pelas células endoteliais. (Baseado em GALLEY e WEBSTER, 2004)

1.8.1 Características morfológicas e funcionais das células endoteliais

As células endoteliais têm perfil heterogêneo e apresentam funções distintas de acordo com o microambiente no qual estão inseridas. Além da variação funcional, o tamanho das células também difere de acordo com a localização. Nas artérias encontram-se células endoteliais mais robustas do que as dos capilares e veias, provavelmente para suportar a maior pressão do sangue arterial (AIRD, 2007a). As junções comunicantes nas células endoteliais das veias são mais frouxas (SIMIONESCU *et al.*, 1976; AIRD, 2007b) e mais atuantes na resposta inflamatória do que as células endoteliais das artérias (ERIKSSON *et al.*, 2005; AIRD, 2012; DEJANA, *et al.*, 2016).

A circulação sanguínea é dependente da permeabilidade dos vasos por um processo coordenado e controlado ativamente pelas vias transcelular e paracelular de transporte, envolvendo o rearranjo de junções intercelulares, tráfego de vesículas e do citoesqueleto celular (VESTWEBER *et al.*, 2010). Qualquer alteração no microambiente vascular gera um controle dinâmico que regula a velocidade de transporte de macromoléculas, resposta de células do sistema imune, além de acúmulo de proteínas de matriz extracelular junto à

parede dos vasos, constituindo, assim, o reparo tecidual (GODDARD e IRUELA-ARISPE, 2013).

1.8.1.1. Transportes Transcelular e Paracelular

A via transcelular ocorre no interior das células com o transporte de macromoléculas dos vasos para o espaço intersticial, por meio de vesículas, as cavéolas e as organelas vacúolo-vesiculares (VVOs) e por canais transcelulares (DVORAK e FENG, 2001; MEHTA e MALIK, 2006; VALENTIJN *et al.*, 2010). Cavéolas são vesículas formadas por unidades da proteína caveolina-1, que atuam no transporte de albumina e outras proteínas do plasma, regulam o transporte de substâncias hidrofóbicas, como colesterol, ácidos graxos e hormônios (revisto em MEHTA & MALIK, 2006) e é transportada para a membrana exocitando seu conteúdo (revisto em YOON *et al.*, 2014). As VVO são estruturas citoplasmáticas que variam de 80 a 140 nm de diâmetro, envolvidas também no transporte de macromoléculas, não expressam caveolina-1 e, por interconexão, alterem seu formato constituindo canais paracelulares que são exocitados na superfície pelas células endoteliais (MOURIK *et al.*, 2014).

A via paracelular corresponde à via que ocorre nas regiões de especialização da célula endotelial e no espaço intercelular, regulada pelas junções intercelulares dos tipos aderentes e de colusão, que atuam como uma barreira seletiva de solutos e células. Através da diferença no gradiente eletroquímico, entre o interior dos vasos e o meio extravascular, ocorre o transporte de íons e pequenas moléculas, num transporte passivo (revisto em Gunzel e Yu, 2013).

1.8.1.2 Junções intercelulares

As células endoteliais se conectam umas as outras por um complexo de proteínas transmembranares, ligadas às proteínas intracelulares ancoradas nos filamentos de actina. Essa interação dá estabilidade às junções intercelulares, a sua regulação dinâmica de abertura e fechamento e manutenção da morfologia e

polaridade das células endoteliais (SHELDON *et al.*, 1993; STEVENS *et al.*, 2000; BAZZONI e DEJANA, 2004). Esse conjunto de proteínas, que funciona como barreira endotelial e na comunicação célula-célula, forma estruturas complexas, conhecidas como junções: aderente, de oclusão e comunicantes (WALLEZ e HUBER, 2008).

No endotélio, as Junções Aderentes (JA) estão distribuídas ao longo da vasculatura e são expressas em vasos linfáticos e sanguíneos. Constituídas por diversas proteínas, dentre elas a VE-caderina, uma proteína de adesão transmembranar da família das Caderinas, específica de células endoteliais (revisto em BAZZONI e DEJANA, 2004). As Junções de Oclusão (JO) são formadas por proteínas com domínio intra- e extracitoplasmático: ocludina, claudina e as moléculas de adesão juncional (MAJ). A ocludina é encontrada exclusivamente nas JO de células epiteliais e endoteliais (revisto em BAZZONI e DEJANA, 2004). No endotélio, a expressão desta proteína varia de acordo com a permeabilidade dos leitos vasculares. Quanto às MAJ, já foram descritas JAM-1, expressa nas células epiteliais e endoteliais, JAM-2 e JAM-3, presentes somente nas células endoteliais (revisto em MEHTA e MALIK, 2006). Por fim, as Junções Gap (JG) são formadas por agrupamentos de proteínas transmembranares, as conexinas. Essas proteínas formam canais de comunicação entre as células endoteliais, com a troca direta de moléculas de sinalização e íons. Assim, as JG são consideradas cruciais à manutenção da homeostasia celular, além da regulação do crescimento e diferenciação celular, resposta vasoativa das células endoteliais e condução elétrica nos tecidos excitáveis (revisto em MEHTA e MALIK, 2006).

Além dessas estruturas encontradas nas células endoteliais, todas as outras estruturas comuns às células eucarióticas, tais como, retículo endoplasmático, Golgi, mitocôndrias e citoesqueleto podem ser vistas. Numerosas vesículas livres no citoplasma ou intimamente associadas à superfície celular, cuja função principal é transportar fluidos e proteínas entre o sangue e interstício celular. Há de se destacar uma organela específica das células endoteliais, os corpúsculos de Weibel-Palade, que serão descritos a seguir.

1.8.1.3 Corpúsculos de Weibel-Palade

Os corpúsculos de Weibel-Palade (CWP) foram descritos pela primeira vez em 1964, por Ewald R. Weibel e George E. Palade, no citoplasma de células endoteliais de vários órgãos de ratos e humanos, utilizando microscopia eletrônica de transmissão. Estas organelas apresentam estrutura alongada em forma de bastonetes, medem cerca de 0,1-0,2 μm de largura e de 1-5 μm de comprimento e contém túbulos finos, conferindo um aspecto estriado à organela ao longo do seu eixo longitudinal (WEIBEL e PALADE, 1964; ZENNER *et al.*, 2007; VALENTJIN *et al.*, 2008; BERRIMAN *et al.*, 2009). Em corte transversal, esses túbulos eletrondensos apresentam um diâmetro interno de 12 nm, circundados por uma matriz menos densa (a depender da sua maturação) e organizados em feixes paralelos envoltos por uma bicamada lipídica (VALENTIJN *et al.*, 2008). O aspecto estriado dos CWP, observado por análise ultraestrutural, é em decorrência do seu conteúdo de túbulos, constituído principalmente por proteínas do fator de von Willebrand (FVW), sendo um pré-requisito para a existência desses corpúsculos (WAGNER *et al.*, 1982). Quanto à localização dos CWP, esta se altera ao longo do processo de sua maturação: quando imaturos possuem localização perinuclear, na região do Golgi, e são eletronalucientes, com discretos e desorganizados túbulos, enquanto os maduros têm distribuição na periferia da célula e se apresentam drasticamente mais eletrondensos. Esse detalhe durante a maturação dos CWP tem sido justificado pelo aumento do número de túbulos, com sua compactação, diminuindo, assim, o espaço entre eles (ZENNER *et al.*, 2007; METCALF *et al.*, 2008). Esse processo é acompanhado pela queda do pH no interior da organela e a perda de clatrina que fica junto à membrana do corpúsculo. Na sequência, os corpúsculos vão se distanciando uns dos outros, ficando mais dispersos pelo espaço citoplasmático (VAGNER *et al.*, 1986; VALENTJIN *et al.*, 2011).

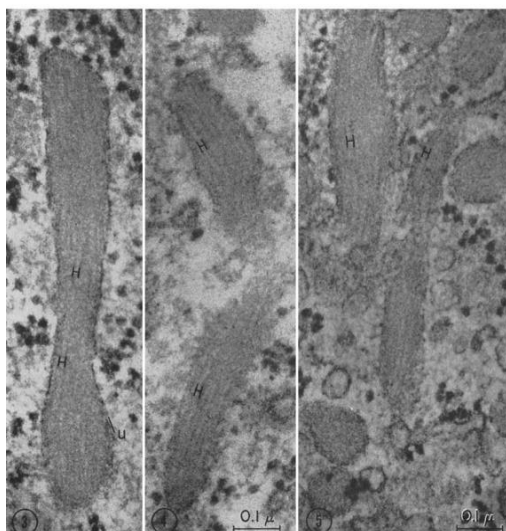


Figura 1.4 - Esquema etapas de síntese e fator de von Willebrand corpúsculos de WP. de VAGNER *et al.* (1986) e VALENTJIN *et al.* (2011).

simplificado das armazenamentos e maturação dos Esquema modificado

Então, o principal constituinte dos CWP é o fator de von Willebrand, uma glicoproteína multimérica que, em casos de lesão vascular, é liberada pela célula endotelial promovendo a agregação plaquetária (WAGNER *et al.*, 1982). O FVW, quando secretado, interage com a matriz extracelular, conferindo maior sustentação ao tecido endotelial durante a restauração da hemostasia (VAGNER, 1990). A conformação dessa proteína está intimamente relacionada à sua função, apresentando características morfológicas tubulares e variando muito de tamanho, podendo chegar a 1300 nm, o que faz do FVW a maior proteína solúvel. Quando liberadas, funcionam como “cordas adesivas” que ancoram as plaquetas no sítio da lesão e impede o extravasamento de componentes do sangue. Desta forma, é necessária a compactação dessa proteína no interior dos corpúsculos (KOMAR *et al.*, 2006; GROOT *et al.*, 2007; VALENTIJN *et al.*, 2010). As dobraduras do fator de von Willebrand são apontadas como responsáveis pela morfologia tubular dos corpúsculos, e acredita-se que essa arquitetura propicie a rápida liberação do fator no meio extracelular (VALENTIJN *et al.*, 2011).

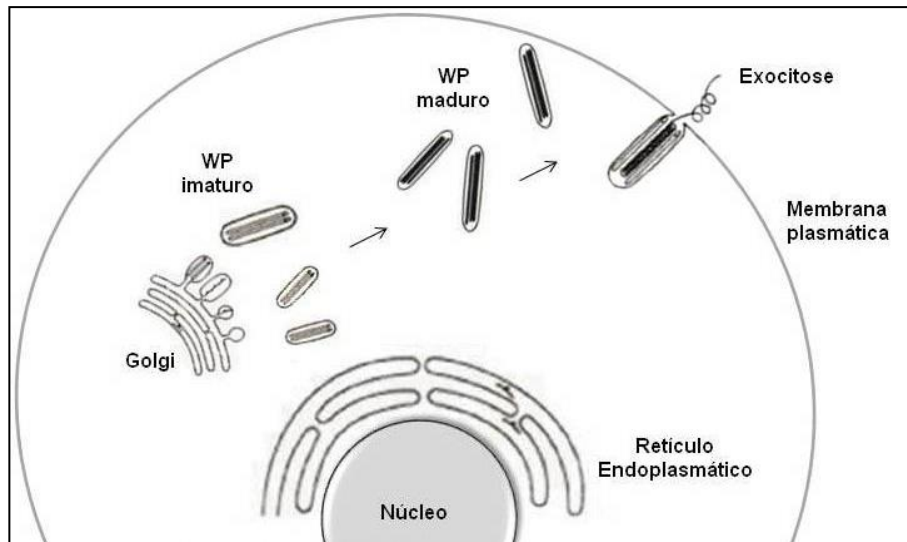


Figura 1.5 - Ultraestrutura dos corpúsculos de Weibel-Palade mostrando a forma em bastão no interior de células endoteliais da artéria pulmonar de ratos com aspecto estriado pela presença de túbulos (H) (WEIBEL e PALADE, 1964).

A biogênese dos corpúsculos é complexa e se inicia pela síntese do precursor do fator de von Willebrand (pró-FVW) no retículo endoplasmático, que se direciona ao Golgi, onde dímeros do pró-FVW se unem e formam multímeros que se condensam em túbulos. A seguir, ocorre o processo de glicosilação sendo, então, os túbulos liberados pela rede trans-Golgi no citoplasma em forma de vesículas (ZENNER *et al.*, 2007; VALENTIJN *et al.*, 2011). Na ausência do FVW não ocorre a formação dos corpúsculos de Weibel-Palade (DENIS *et al.*, 2001; HABERICHTER *et al.*, 2005; VALENTIJN *et al.*, 2010). O processo de formação dos corpúsculos é dependente do revestimento de clatrina e da proteína adaptadora AP-1. A inibição de qualquer uma dessas proteínas resulta em uma falha na formação de WPB, o que impede a secreção do FVW (ROBERTS *et al.*, 2005; NIGHTINGALE *et al.*, 2013).

Os corpúsculos de WP também abrigam diversos outros componentes envolvidos nas diferentes funções da célula endotelial para o controle da hemostasia. Além do FVW, essas organelas armazenam ativadores da cascata de coagulação (JACQUEMIN *et al.*, 2006; RONDAIJ *et al.*, 2006), reguladores da resposta inflamatória, como P-selectina (uma importante molécula de adesão

leucocitária) (MC EVER *et al.*, 1989; BONFANTI *et al.*, 1989; RONDAJI *et al.*, 2006), Eotaxina (OYNEBRATEN *et al.*, 2004; RONDAJI *et al.*, 2006), IL-8 (uma citocina pró-inflamatória) (UTGAARG *et al.*, 1998; WOLFF *et al.*, 1998; RONDAJI *et al.*, 2006), angiopoietina (FIEDLER *et al.*, 2004; RONDAJI *et al.*, 2006) e CD63, uma molécula encontrada na membrana de lisossomos, e também expressa na membrana da célula endotelial em casos de inflamação (VISCHER *et al.*, 1993; KOBAYASHI *et al.*, 2000; RONDAJI *et al.*, 2006).

O conteúdo dos corpúsculos é heterogêneo e pode variar de acordo com a subpopulação da célula endotelial e durante o seu processo de maturação. Nesse caso, algumas proteínas, dentre elas a P-selectina, CD63 e Rab27a vão sendo incorporadas aos corpúsculos durante seu amadurecimento (HANNAH *et al.*, 2003; HARRISON *et al.*, 2006; METCALF *et al.*, 2008). Desta forma, dependendo do estágio do corpúsculo, o seu conteúdo pode variar até dentro de uma única célula. O estado da célula também influencia no conteúdo dos corpúsculos, sendo a célula endotelial altamente responsiva. Quando ativada, ela passa a armazenar IL-8 em resposta à estimulação por citocinas pró-inflamatórias, como IL-1. Assim como, a eotaxina é direcionada para os corpúsculos seguida da estimulação da célula por IL-4. Após sofrer uma nova ativação, esses fatores são prontamente liberados pelo endotélio (WOLF *et al.*, 1998).

Considerando-se a ampla variedade de moléculas armazenadas nos corpúsculos e a especificidade na resposta da célula endotelial frente aos diferentes estímulos, muitos trabalhos concentraram esforços para elucidar os mecanismos envolvidos no controle da liberação dessas moléculas. Desta forma, as três principais vias demonstram que, após a célula ser estimulada por um agonista, a exocitose do CWP pode ocorrer de forma total, onde a membrana do corpúsculo se funde à membrana celular e libera os seus componentes (ROMANI *et al.* 2003; VALENTIJN *et al.*, 2011) e/ou de forma seletiva, quando ocorre a fusão parcial e transitória da membrana do corpúsculo à membrana celular. Nesse caso, a fusão ocorre em uma porção estreita e permite apenas a liberação de pequenas moléculas, como IL-8 e CD63. Isso resulta na apresentação dos corpúsculos na forma esférica (BABICH *et al.*, 2008; VALENTIJN *et al.*, 2011). Uma terceira via é a forma multigranular, em que pequenas vesículas são formadas a partir dos

corpúsculos de Weibel Palade no citoplasma e são liberadas (VALENTIJN *et al.*, 2010).

1.8.1.4 Resposta do endotélio à ativação

Em condições fisiológicas, o endotélio encontra-se em estado de repouso, passando a ser responsivo em caso de lesão por estresse e durante um processo inflamatório. A comunicação entre as células endoteliais é necessária para uma resposta tecidual eficiente (POLACEK *et al.*, 1997). A ativação por citocinas, como IL-1 e TNF- α , e a presença de agentes patogênicos ou antígenos, gera um painel de eventos moleculares que levam à ativação dessas células, que passam a expressar um fenótipo pró-inflamatório (VALBUENA e WALKER, 2006).

Uma vez ativada, a célula endotelial secreta fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas que sinalizarão para as células endoteliais adjacentes, que também serão ativadas. Essa sinalização parácrina permite uma efetiva resposta do endotélio. A monocamada endotelial forma uma barreira física semipermeável que permite apenas a passagem de células do sistema imune e algumas moléculas. Esse processo é controlado ativamente pela produção de mediadores inflamatórios, como IL-1, IL-6 e TNF- α , e a expressão de moléculas de adesão, como I-CAM, V-CAM e E-Selectina (BIERHAUS *et al.*, 2000; JORDAN *et al.*, 2007). Essas proteínas estão presentes na membrana da célula endotelial e permitem a adesão de leucócitos e o seu rolamento na superfície endotelial. Esse processo também regula as junções celulares que, nesses casos, ficam mais frouxas e permitem a passagem dos leucócitos entre as células endoteliais (diapedese) (HIPPIENSTIEL *et al.*, 2003; TREPPELS *et al.*, 2006; RAJENDRAN *et al.*, 2013). Existem, ainda, algumas outras funções exercidas pela célula endotelial que não são bem esclarecidas, dentre elas, o seu papel como célula apresentadora de antígeno. Esse tipo celular é capaz de expressar MHC I e II e apresentar o antígeno em sua superfície para linfócitos T (MAI *et al.*, 2013). Por isso, o estudo da interação desse tipo celular e agentes infecciosos tem relevância (HIPPIENSTIEL *et al.*, 2003).

1.8.2 CULTIVO PRIMÁRIO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DA VEIA DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO (HUVEC)

O sucesso da cultura de células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVEC) começou há quatro décadas, pelo método estabelecido por JAFFE *et al.* (1973) e deu início aos estudos da biologia vascular moderna (NACHMAN e JAFFE, 2004). A possibilidade de cultivo dessas células por períodos longos revolucionou o estudo da biologia celular do tecido endotelial (JAFFE *et al.*, 1973, JIMÉNEZ *et al.*, 2013). O estabelecimento de culturas de HUVEC é baseado numa metodologia simples que permite diferentes abordagens da biologia endotelial normal e durante diferentes patologias relacionadas ao endotélio, dentre eles, os distúrbios metabólicos (WANG *et al.* 2017), angiogênese (GOODWIN *et al.*, 2017), testes de citotoxicidade (CAO *et al.*, 2017) e interação com patógenos (KRAUS *et al.*, 2004; STUMBO *et al.*, 2008; RICHARD *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, vários protocolos têm sido propostos para isolar HUVEC (MARIN *et al.*, 2001; BAZZONI *et al.*, 2002; LAURENS e BAUDIN *et al.*, 2007; DAVIS *et al.*, 2007). Para pesquisa básica as HUVEC, como células primárias e não imortalizadas de origem humana, são fáceis de isolar com baixa contaminação por outros tipos celulares. As veias umbilicais podem ser canuladas e o endotélio destacado por atividade enzimática (MANCONI *et al.*, 2000; JIMÉNEZ *et al.*, 2013). Quanto a sua propagação *in vitro*, diferentes tipos de meios, suplementos e revestimentos específicos do endotélio têm sido adotados (JAFFE *et al.* 1973b; LEWIS *et al.*, 1973; GIMBRONE *et al.*, 1974; MACIAG *et al.*, 1981; CHAVOZ *et al.*, 1981; CLARK *et al.*, 1986; ALBELDA *et al.*, 1989). Por exemplo, fibronectina e colágenos intersticiais I e III favorecem a migração e proliferação de células endoteliais, enquanto os componentes da lâmina basal, como laminina e colágeno IV, promovem adesão e diferenciação de células endoteliais (GRANT *et al.*, 1990). Então, HUVEC com um fenótipo de paralelepípedos *in vitro* podem ser obtidas em superfícies revestidas com matriz de membrana basal, fibronectina ou gelatina, seguindo um procedimento de revestimento simples por adsorção (MARTINS-GREEN *et al.*, 2008; JIMÉNEZ *et*

al., 2013). Além disso, as células em cultura mostram corpúsculos de Weibel-Palade, cavéolas e complexos juncionais (WEIBEL E PALADE, 1964; DEJANA, 2004; LEBBINK *et al.*, 2010) comparável à situação *in vivo* e podem internalizar lipoproteínas de baixa densidade humana (JIMÉNEZ *et al.*, 2013). Adicionalmente, podem ser caracterizadas pela expressão de proteínas de membrana, como CD31 e PECAM. Acredita-se que o fácil isolamento e a garantia da preservação das características fenotípicas, entre as primeiras passagens, fizeram da HUVEC o modelo de tecido endotelial mais utilizado em estudos *in vitro*, com cerca de 10 000 publicações já contabilizadas (JAFFE *et al.*, 1973; MANCONI *et al.*, 2000; JIMÉNEZ *et al.*, 2013).

1.8.3. CÉLULA ENDOTELIAL e *T. gondii*

As células endoteliais estão presentes em pontos estratégicos da disseminação do parasito e as consequências clínicas mais graves da toxoplasmose são a encefálica, congênita e ocular. Desta forma, alguns grupos de pesquisa se propõem a estudar como ocorre a interação das células endoteliais com o *T. gondii* e os mecanismos envolvidos na disseminação do parasito, através do endotélio presente na barreira hemato-encefálica, na retina e na veia do cordão umbilical.

O Sistema Nervoso Central (SNC) dispõe de uma barreira celular, chamada barreira hemato-encefálica, que protege este sistema de patógenos e regula a passagem de células do sistema imune, conferindo um ambiente muito bem controlado (FEUSTEL *et al.*, 2012). Considerando-se a gravidade da infecção no SNC, alguns estudos concentram esforços a fim de elucidar como ocorre a passagem de *T. gondii* por essa barreira. Em 2016, um importante estudo *in vivo* demonstrou que as células endoteliais da barreira hemato-encefálica representam um importante nicho para a replicação do parasito para a posterior invasão do SNC, o que poderia explicar como o *T. gondii* penetra neste sistema (KONRADT *et al.*, 2016).

A toxoplasmose ocular é a principal causa de retinocoróidite no mundo. A subpopulação de células endoteliais da retina é descrita como mais permissivas

à infecção pelo parasito, quando comparadas a outras subpopulações (SMITH *et al.*, 2004; ZAMORA *et al.*, 2008). Além disso, já foi demonstrado que *T. gondii* é capaz de transmigrar entre as células do endotélio da retina. Em um estudo *in vitro*, as células endoteliais da retina infectadas por *T. gondii* mostraram maior expressão de moléculas de adesão I-CAM em sua superfície, e ensaios bloqueando essa molécula resultaram em uma menor transmigração do parasito através da barreira endotelial (FURTADO *et al.*, 2012). Esses achados corroboram os trabalhos anteriores que descreveram a maior expressão de I-CAM em células endoteliais da barreira hemato-encefálica (LACHENMAIER *et al.*, 2010) e interação da proteína MIC2 e I-CAM como componentes importantes para a migração do parasito através dessas barreiras (BARRAGAN *et al.*, 2005).

Outra importante célula endotelial estudada são as células endoteliais presentes na veia do cordão umbilical. Por estar presente na rota da toxoplasmose congênita, esse tipo celular representa um ótimo modelo *in vitro* para o estudo da transmissão vertical do parasito. Ensaios utilizando células endoteliais da veia do cordão umbilical bovino (BUVEC) demonstram a capacidade de *T. gondii* em invadir e ativar essas células rapidamente, regulando o aumento da transcrição gênica de moléculas de adesão E-selectina, P-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 (TAUBERT *et al.*, 2006).

Woodman e colaboradores (1991) demonstraram que células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVEC) ativadas por interferon gama são capazes de inibir a replicação de *T. gondii* e permitir a fusão de lisossomos aos vacúolos parasitóforos (WOODMAN *et al.*, 1991; CORTEZ *et al.*, 2005). Além disso, ensaios utilizando microscopia eletrônica revelam a presença de NAD(P)H-oxidase na membrana de HUVEC ativada e posteriormente, no interior de alguns vacúolos parasitóforos, o que sugere que a produção de superóxido é um dos mecanismos utilizados pela célula para combater a infecção (CORTEZ *et al.*, 2005).

Uma vez no interior da célula hospedeira, o parasito é capaz de recrutar organelas (DE MELLO *et al.*, 1992; SINAI *et al.*, 1997; LALIBERTE *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2014; GARCIA, 2016) e modular o metabolismo mitocondrial (SINAI E JOINER, 1997; CARMEN *et al.*, 2006; DA SILVA, 2013; DE OLIVEIRA, 2014). Estudos realizados por Stumbo e colaboradores observaram uma

importante proteína de regulação da função mitocondrial, HGMB1, localizada ao redor da membrana do vacúolo parasitóforo em HUVEC (STUMBO *et al.*, 2008). Além disso, outros dados do mesmo grupo revelam que o parasito é capaz de modular negativamente a expressão gênica de proteínas da família Bcl-2 e, com isso, bloquear a apoptose celular garantindo o sucesso do parasitismo (DA SILVA, 2013)

II. JUSTIFICATIVA

O emprego de HUVEC nos estudos da toxoplasmose experimental é limitado a uns poucos trabalhos, muito embora o entendimento do trânsito físico e molecular do parasito pelo cordão umbilical até alcançar o embrião, não tenha sido elucidado. Esse aspecto, associado à gravidade da transmissão vertical do *T. gondii*, acarretando danos neurológicos irreversíveis ao feto, merece ser melhor explorado e esta é a proposta dessa dissertação: contribuir para melhorar a compreensão deste processo.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL: Analisar aspectos celulares da interação do *Toxoplasma gondii* e célula endotelial de cordão umbilical humano, *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Caracterizar, morfológica e funcionalmente, culturas primárias de células endoteliais humanas da veia de cordão umbilical (HUVEC), com ênfase na biogênese dos corpúsculos de Weibel-Palade;
2. Avaliar comparativamente a infecção de culturas de HUVEC por taquizoítos de *T. gondii* (cepas ME-49 e RH) frente a diferentes cargas parasitárias e métodos de obtenção;
3. Identificar, ultraestruturalmente, os eventos intracelulares decorrentes da interação de *T. gondii* e HUVEC;
4. Avaliar o estabelecimento da cistogênese de *T. gondii* em HUVEC.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE VEIA UMBILICAL HUMANA (HUVEC)

Os cordões umbilicais humanos foram doados por meio de uma cooperação técnico-científica estabelecida entre o Hospital Naval Marcílio Dias e o Laboratório de Biologia Estrutura do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. As células endoteliais foram isoladas da veia umbilical humana pelo método previamente estabelecido por Jaffe *et al.* (1973) e modificado por Stumbo *et al.* (2002). A técnica consiste em manter os cordões em solução de salina tamponada com fosfato (PBS) 1x, pH 7.2, acrescido de 1% de anfotericina a 4°C. Inicialmente, os cordões foram canulados com agulha de 18g, vedados com um “clamp” umbilical e a veia umbilical lavada com PBS 1x contendo 2% de glicose, objetivando eliminar os coágulos e células sanguíneas. Após esse procedimento, a outra extremidade do cordão foi vedada e injetada na luz da veia umbilical uma solução a 0,06% de colagenase tipo IA (Sigma-Aldrich) para a dissociação das células endoteliais. Para a efetiva ação da enzima, o cordão foi transportado para o banho Maria a 37°C, mantendo-se imerso em PBS por 5 min. Seguida da ação enzimática, as células dissociadas foram recolhidas, pela injeção na luz da veia umbilical, com uma solução de PBS contendo 2% de glicose e centrifugadas a 200g por 7 min. O sedimento dessas células foi ressuspensão em meio Eagle Modificado por Dulbeco (DMEM/Ham F12) (Sigma-Aldrich) contendo 20% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab) e as células plaqueadas em superfície plástica revestidas com 2% de gelatina (Sigma-Aldrich) diluída em PBS. As células endoteliais obtidas foram cultivadas em meio DMEM-F12 e EGM-2 (Lonza) (concentração 1:1) suplementado com 2% de SFB e fatores de crescimento: hidrocortisona (0,04%), fator de crescimento básico de fibroblasto - FGF-B (0,001%), fator de crescimento semelhante à insulina R³IGF-1 (0,001%), fator de crescimento epidermal - EGF (0,001%), fator de crescimento endotelial - VEGF (0,001%, ácido ascórbico (0,001%), heparina (0,001%) e sulfato de gentamicina e anfotericina B (0,001%) (todos os reagentes da Lonza) a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂ por 4 - 7 dias, com troca do meio a cada 2 dias. Após atingir a confluência, as células foram dissociadas em solução de dissociação contendo 0,25% de tripsina (Sigma-Aldrich) e 0,01% de EDTA (Sigma-Aldrich) e utilizadas até a quarta passagem.

4.2 CULTURA DA LINHAGEM CELULAR EPITELIAL RENAL (VERO)

Células da linhagem Vero, oriundas do epitélio distal normal do córtex renal de macaco verde (ATCC® CCL-81™), foram semeadas na concentração de $1,0 \times 10^5$ /mL em garrafas de cultura celular de 25 cm², em meio DMEM F12, suplementado com 1% solução antibiótica e 10% SFB. As células foram mantidas na estufa em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. A cada dois dias, o meio foi descartado e o mesmo volume de meio fresco adicionado até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Para o subcultivo, as células foram incubadas em solução de dissociação contendo PBS suplementado com 0,01% de EDTA e 0,25% de tripsina durante 5 min a 37°C. Após dissociação, foi adicionado meio DMEM/F12 com 10% SFB a 4°C à suspensão celular para inibir a ação da tripsina e as células centrifugadas durante 7 min a 174 g na mesma temperatura. Após a centrifugação, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e mantidas semiconfluentes em garrafas de 25 cm³ (1×10^6 células/garrafa), sendo o meio trocado a cada 2 dias. A viabilidade das células foi avaliada pela coloração com azul de tripan a 0,4%, uma substância que fica retida no interior de células mortas, devido à alteração da integridade da membrana, permitindo assim, uma quantificação somente de células vivas. As culturas que apresentavam células com viabilidade maior que 95% foram utilizadas nos experimentos.

4.3 OBTENÇÃO DOS PARASITOS

A cepa de *Toxoplasma gondii* do tipo II (ME-49, cistogênica) utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli (Laboratório de Imunopatologia, Instituto René Rachou, Belo Horizonte, MG, Brasil) e a cepa do tipo I (RH, virulenta) foi cedida pela Dra. Lais de Carvalho (Laboratório de Pesquisa em Células-Tronco, Instituto de Biologia, UERJ).

4.3.1 TAQUIZOÍTOS de *T. gondii* RECOLHIDOS DO SOBRENADANTE DE CÉLULAS VERO

A obtenção de taquizoítos da cepa ME-49 foi estabelecida primariamente a partir da infecção de células Vero com formas bradizoítas de *T. gondii*. Em resumo: camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com 30 cistos por via intraperitoneal e, após cerca de 4-8 semanas, seus cérebros foram coletados, os cistos purificados e rompidos para obtenção de formas bradizoítos (Guimarães *et al.*, 2008). Assim, a partir da infecção das culturas com bradizoítos, cerca de 5 a 7 dias pós-infecção, quando o ciclo lítico se estabeleceu liberando os parasitos, os taquizoítos foram recolhidos do sobrenadante e centrifugados a 200g por 7 min, a temperatura ambiente, para remoção de debris celulares, seguida de outra centrifugação a 1000 g por 10 min para sedimentação dos taquizoítos. O sedimento obtido, rico em taquizoítos, foi ressuspenso em meio DMEM com 10% de soro, quantificado em câmara de Neubauer e utilizado para infecção de cultura de células (Garcia, 2016). Para obtenção de taquizoítos da cepa RH, camundongos da linhagem Swiss Webster foram infectados intraperitonealmente com 10^4 taquizoítos, e cerca de 2-3 dias pós-infecção, foram recolhidos do peritônio. Assim, os taquizoítos desta cepa, provenientes da infecção *in vivo* foram a fonte de infecção primária de células Vero, e cerca de 2 a 5 dias pós-infecção, foram processados como descrito anteriormente. Desta forma, os taquizoítos de ambas as cepas foram sucessivamente transferidos para uma nova cultura visando a manutenção de taquizoítos e utilizados nos ensaios experimentais.

4.3.2 TAQUIZOÍTOS DAS CEPAS RH E ME49 de *T. gondii* PROVENIENTES DA LISE MECÂNICA DE CULTURAS VERO

Os taquizoítos das cepas ME49 e RH de *T. gondii* foram isolados de cultura de células Vero, após cerca de 4 dias de infecção. As células foram destacadas do substrato com auxílio de um raspador de células e submetidas à lise mecânica utilizando agulhas nos calibres 18 g, 21g, e 26 g, respectivamente. O produto foi centrifugado por 7 min a 200 g para sedimentar debris celulares, descartado o pellet e o sobrenadante centrifugado a 200 g para sedimentar os taquizoítos. O pellet foi ressuspenso em meio DMEM com 10% de soro e quantificado em câmara de Neubauer e utilizado para infecção das culturas de HUVEC.

4.4 ENSAIOS DE INFECTIVIDADE E ANÁLISE DO DESTINO INTRACELULAR DE TAQUIZOÍTOS DE *T. gondii* FRENTE A CÉLULA ENDOTELIAL DA VEIA DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO (HUVEC)

As células endoteliais foram semeadas em placas de 24 poços ou placas de 60 mm, por 24 h e, então, infectadas com taquizoítos provenientes de células Vero por diferentes métodos de obtenção, como descrito no item 4.3. Para avaliar a cinética de infecção de taquizoítos da cepa ME-49 e verificar se o método de obtenção desses parasitos apresentava interferência na sua infectividade frente às HUVEC foram utilizadas as relações parasito-célula hospedeira de 10:1 e 5:1 de parasitos obtidos do sobrenadante e por rompimento mecânico de células Vero. A fim de comparar a diferença de infectividade entre cepas polares, esse mesmo ensaio foi realizado com taquizoítos da cepa RH. Para os ensaios com taquizoítos da cepa RH obtidos de sobrenadante e obtidos pelo rompimento das células utilizamos as relações parasito-célula hospedeira de 1:10 e 1:5.

4.5 PROCESSAMENTO DAS CULTURAS HUVEC PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

As culturas infectadas foram coradas pelo Kit panótico rápido (Laborclin), onde primeiro as células foram fixadas em triarilmetano a 0,1% por 30 seg, em seguida coradas em xantenos (eosina) a 0,1% e tiazinas (azul de metileno) a 0,1%, por 30 seg cada. Após a coloração, as lamínulas foram montadas em Permunt[®] (Fischer Scientific).

4.6. QUANTIFICAÇÃO DE INFECTIVIDADE DE *T. gondii* EM HUVEC

A análise quantitativa da infectividade de taquizoítos frente à HUVEC foi realizada a partir de três experimentos independentes, em duplicata, sendo quantificadas 200 células por lamínula, considerando-se: o percentual de células infectadas, o número de vacúolos por célula infectada e o número de parasitos

por vacúolos, por períodos de 30 min - 72 h, a fim de determinar a susceptibilidade de infecção e a proliferação dos parasitos no curso temporal da infecção. As amostras foram analisadas com auxílio do microscópio de fluorescência Imager.A2 da Zeiss, utilizando-se objetiva de 100X e as imagens capturadas com a câmara AxioCam MRc. A partir dos resultados, foram calculados média (M) e desvio padrão (DP). A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA e o SigmaPlot 11.0.

4.7 REVELAÇÃO DOS CORPÚSCULOS DE WEIBEL-PALADE EM HUVEC E MARCAÇÃO DE CISTO DE *T. gondii* POR IMUNOCITOQUÍMICA

As culturas de células infectadas por taquizoítos de *T. gondii* e células controles sem infecção foram fixadas após 8 a 96 h de infecção em solução a 4% de paraformaldeído (PFA) diluído em 0,1 M PBS, a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes em PBS, permeabilizadas com Triton-X 100 (Roche) (0,05% em PBS pH 8,0) por 10 min e lavadas com PBS (pH 8,0). O bloqueio de grupamentos aldeídos inespecíficos foi feito com 50 mM cloreto de amônio por 30 min e depois com PBS/BSA 3% por 15 min (3x). Em seguida, para a revelação dos corpúsculos de Weibel- Palade, as células foram incubadas com o anticorpo monoclonal primário anti-fator de von-Willebrand (BD Bioscience) (1:100) overnight. A seguir, as células foram lavadas em PBS (pH 8,0), bloqueadas novamente com PBS/BSA 3% por 15 min e incubadas com anticorpo secundário anti-cabra AlexaFluor 594 (Molecular Probes, USA), diluído 1:400 por 2 horas. Para a marcação da parede cística de *T. gondii* foi utilizada a lectina DBA-RODAMINA (50 µM), que reconhece resíduos de N-acetil galactosamina. A visualização dos núcleos foi feita pela incubação de um intercalante de DNA, o DAPI (4',6diamidino-2-phenylindole) (Sigma-Aldrich) (1:5.000) por 7 min montado no "anti-fading" a 2,5% DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2] octane, Sigma-Aldrich). As amostras foram analisadas com auxílio do microscópio de fluorescência Imager.A2 da Zeiss utilizando-se objetiva de 100X e as imagens capturadas com a câmara AxioCam MRc.

4.8 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Culturas de células controle e infectadas após 24 a 144 h de interação foram lavadas 2x com PBS e fixadas durante 1 h a 4°C com 2,5% glutaraldeído (Sigma-Aldrich) diluído em 0,1 M tampão cacodilato de sódio contendo 3,5% de sacarose e 2,5 mM de CaCl₂ (pH 7,2). As células foram lavadas no mesmo tampão, pós-fixadas com 1% tetróxido de ósmio contendo 0,08% de ferricianeto de potássio (Sigma-Aldrich) a 4°C por 30 min. Após novas lavagens, as células foram destacadas do substrato com um raspador de células (“rubber policeman”) a 4°C e centrifugadas a 10,000g por 5 min. O material em suspensão foi desidratado em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100% 3x), 10 min cada etapa. O material foi infiltrado em resina epóxi (PolyBed® 812 – Polysciences) em acetona 100% (1:2; 1:1; 2:1), cada etapa “overnight” e em epon puro por 4 h, seguido do emblocamento na resina pura e polimerizado por 72 h a 60°C. Cortes ultrafinos (60 nm) foram obtidos e recolhidos em grades de cobre, contrastados em acetato de uranila e citrato chumbo para análise ao microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 (Jeol) da Plataforma de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro e dos microscópios eletrônicos de transmissão JEM-1200 (Jeol) e Tecnai T20, marca FEI Company do Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO) da Unidade de Microscopia Avançada da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.9 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Camundongos fêmeas das linhagens C57BL/6 e “Swiss Webster” foram obtidos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz e mantidos em biotério de experimentação animal do Pavilhão Carlos Chagas sob temperatura controlada, alimentação por ração apropriada e água filtrada *ad libitum*.

Todos os experimentos envolvendo animais foram executados de acordo com as orientações estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-Fiocruz) licença LW-50/14 e sob as regras internacionais

de cuidados na manipulação de animais e agentes patogênicos (“Guidelines on the Care and Use of Animals for Experimental Purposes and Infectious Agents/NACLAR”).

V. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE CULTURAS DE HUVEC

Culturas primárias de HUVEC, obtidas a partir da dissociação do endotélio da veia umbilical com solução de colagenase, foram plaqueadas sobre substrato de gelatina e crescidas em monocamadas com sucesso. As células vivas foram regularmente monitoradas por microscopia de contraste de fase. Com 2 h de plaqueamento mostram ainda arredondamento, sob o efeito da colagenase e baixo espraiamento (Fig. 5.1A). Culturas com 6 h de cultivo mostram maior adesão ao substrato, tendência a formar grupos de células, alinhamento e intenso contato célula-célula para o estabelecimento das regiões de especialização da membrana e formação de uma monocamada (Fig. 5.1B). Detalhe da morfologia dessas células pode ser visto na Figura 5.1C. Culturas subconfluentes, com 48 e 96 h de cultivo, mostraram a dinâmica das células com maior alinhamento, formação de uma monocamada e distribuição mais homogênea ao substrato (Fig. 5.2A e B, respectivamente). Com 5 e 6 dias de cultivo, o crescimento celular adquire uma velocidade média, formando uma monocamada e atinge a confluência com organização polarizada (Fig. 5.2C e D). Nessas condições, as culturas já são passíveis de serem subcultivadas, mantendo suas características morfológicas e fisiológicas, até a 6ª passagem. Essa possibilidade de expansão das células, incluindo o congelamento, facilita muito a execução dos experimentos.

Outro aspecto importante são as organelas específicas da célula endotelial, os corpúsculos de Weibel-Palade localizados no citoplasma da célula, como podem ser visualizados por imunocitoquímica na figura 5.3A e B. Esses CWP são vistos próximos à região nuclear, distribuídos no citoplasma da HUVEC e, durante o processo de exocitose, em contato estreito com a membrana (detalhes serão dados no item de análise ultraestrutural). A microscopia eletrônica de transmissão

mostrou imagens de cortes ultrafinos obtidos perpendicularmente à adesão da monocamada celular de HUVEC ao substrato de cultura com 9 dias (Fig. 5.4A e B). Pode-se visualizar filamentos de actina localizados paralelamente à face interna da membrana plasmática, compondo as fibras de tensão (“stress fibers”) (Fig. 5.4A e B). Características morfológicas associadas ao endotélio *in vivo* foram plenamente reproduzidas *in vitro*. A organização das células justapostas estabelecendo regiões de especialização de membrana, os complexos juncionais, dos tipos junção aderente, oclusão e comunicantes do tipo “gap” (Fig. 5.4 A-D). Várias evidências da presença de organelas endotélio-específicas que armazenam o Fator von Willebrand, os corpúsculos de Weibel-Palade, foram documentadas nas figuras 5.4A e B 5.5A e B.

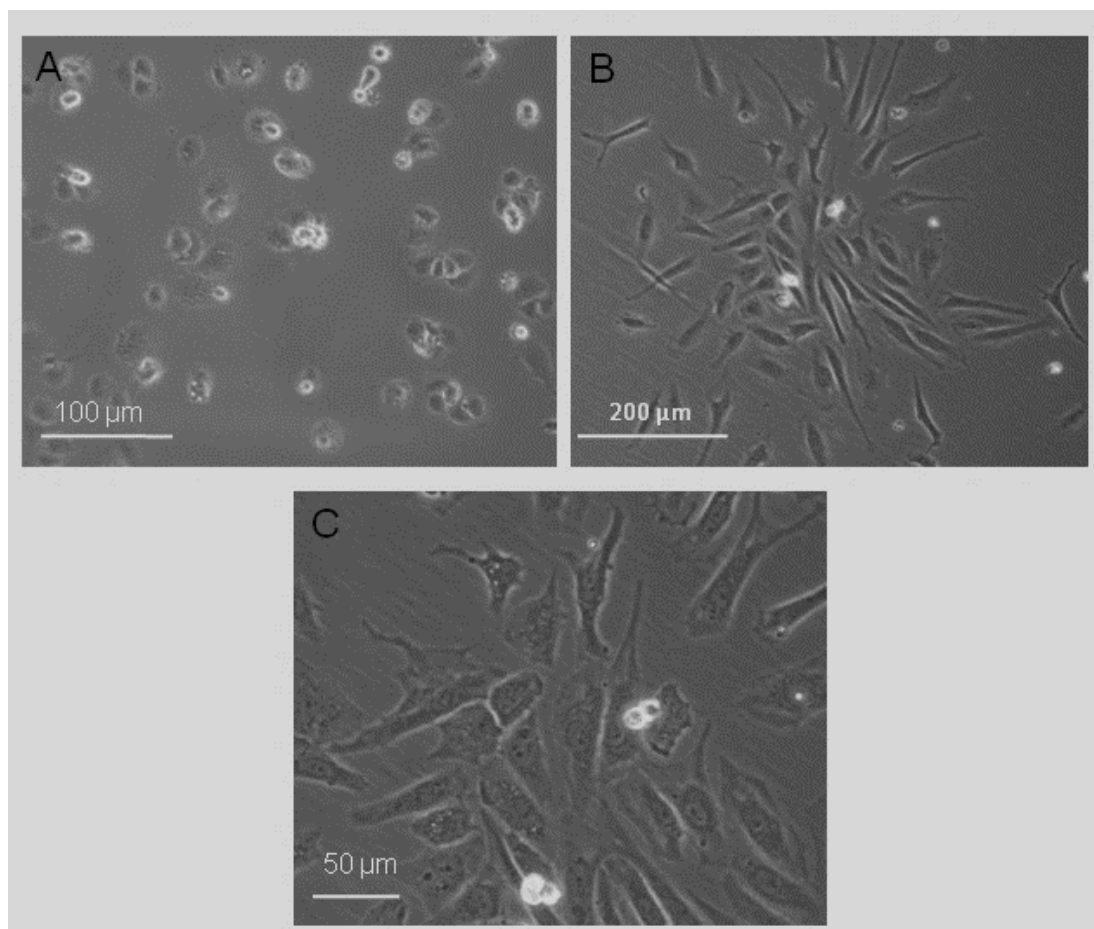


Fig. 5.1 – Cultivo primário de células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVEC): (A) Células aderidas e semi espreiadas após 2 horas de cultivo.

(B) Células após 6 horas de isolamento, pode-se observar o alinhamento das células para formar uma monocamada endotelial e em (C) detalhe em maior aumento da morfologia dessas células.

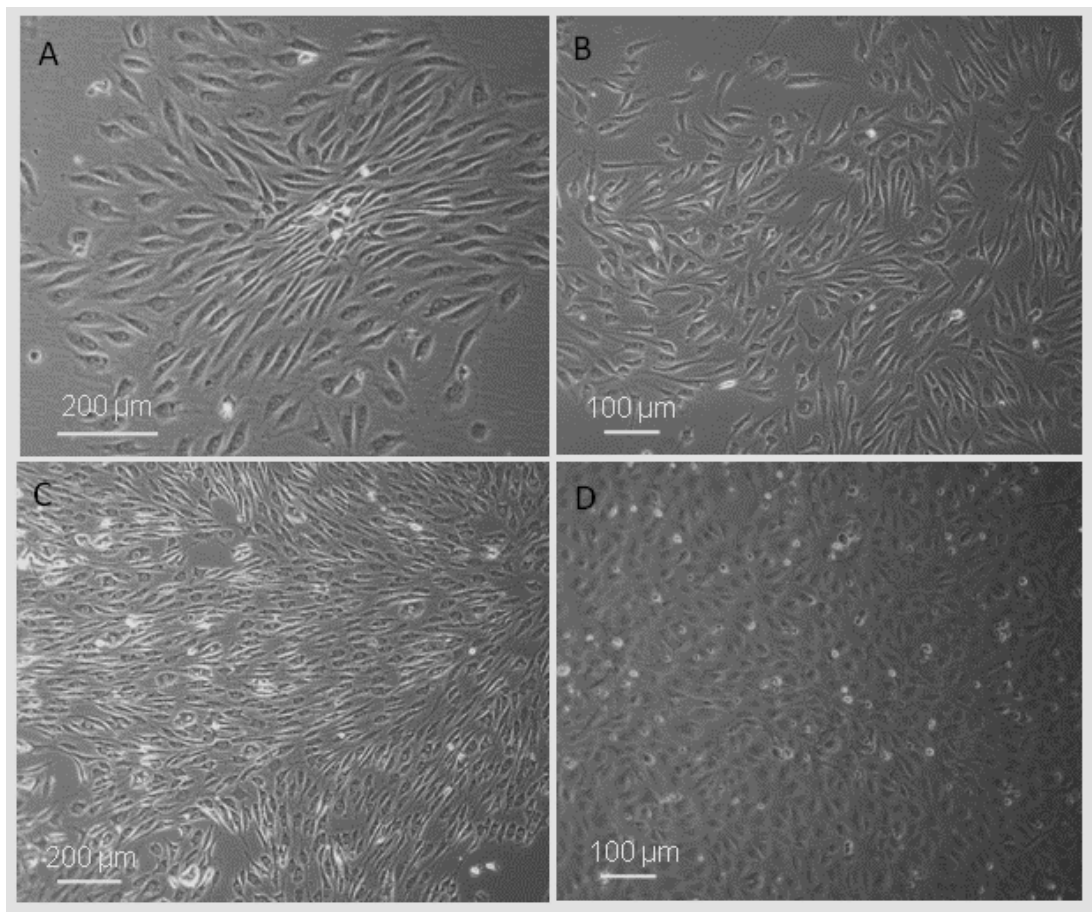


Fig. 5.2 - HUVEC no período de 48 h a 6 dias de cultivo. (A e B) Células com 48 e 96 h respectivamente, mostram sub confluência e organização celular em monocamada. (C e D) Culturas com 5 e 6 dias já se encontram plenamente estabelecidas em confluência e nota-se a predominância de células em formato de paralelepípedo, característico do tecido endotelial, principalmente com 6 dias (D).

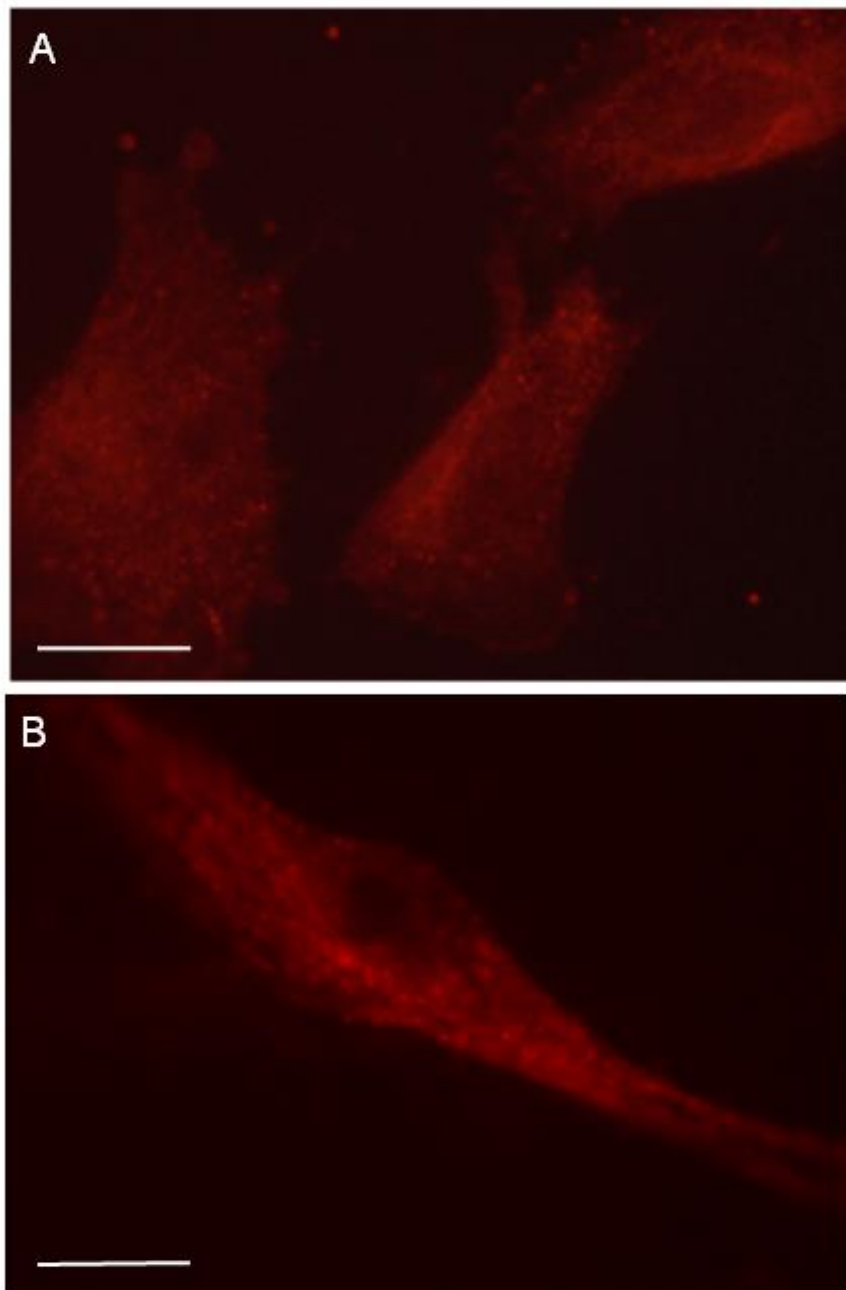


Fig. 5.3 - Corpúsculos de Weibel-Palade em HUVEC. (A e B). Por imunocitoquímica CWP são vistos próximos a região nuclear, distribuídos no citoplasma de HUVEC.

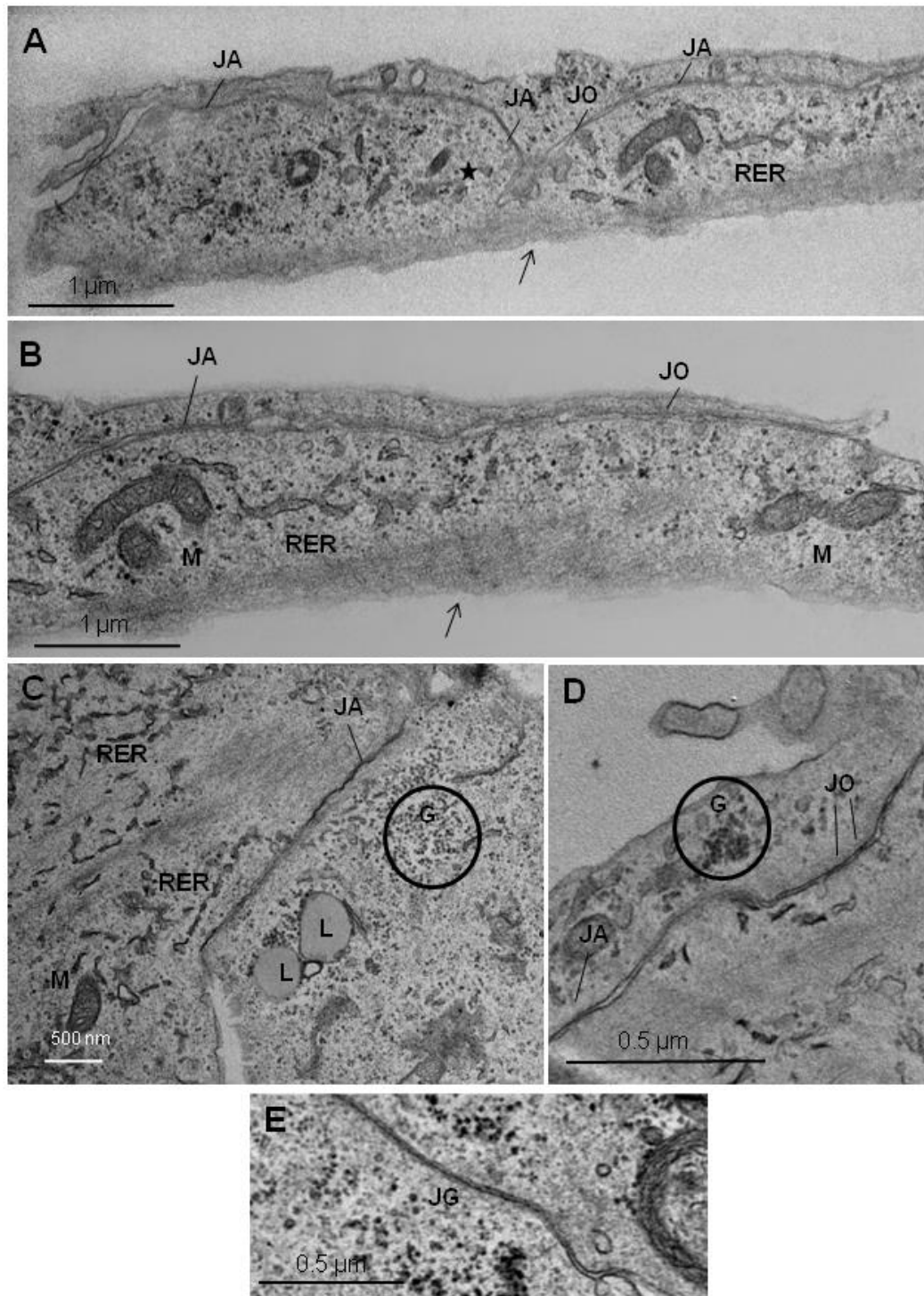


Fig. 5.4 - Caracterização ultraestrutural de culturas HUVEC por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Imagens representativas das diversas características encontradas no endotélio *in vitro*, Corpúsculos de Weibel Palade (★) mitocôndria (M), e o retículo endoplasmático (RER). Além das Junções aderentes (JA) e Junções de oclusão (JO) e junções comunicantes do tipo gap (JG) e a presença de fibras de estresse localizadas na parte basal da célula sinalizado pela seta (A e B), Corpúsculos lipídicos (CL) e ilhas de glicogênio (G).

Aspectos da biogênese e exocitose dos CPW serão tratados no bloco a seguir de resultados. Outras estruturas típicas de células endoteliais foram observadas, como os corpúsculos lipídicos distribuídos pelo citoplasma (Fig. 5.4C) e, algumas vezes, próximas ao núcleo (Fig. 5.5A), no entanto nem todas as células exibiam grande quantidade. Grânulos de glicogênio foram bem evidenciados dispostas pelo citoplasma (Fig. 5.4C) ou em agregados (Fig. 5.4D; 5.5E e G). Grande quantidade de perfis de Golgi foi encontrada na maioria das células (Fig. 5.5B e C) e, como característica padrão, grande vesiculação é observada na região de concentração de Golgi (Fig. 5.5B e C). Próximo ao Golgi, imagens sugestivas de CWP em desenvolvimento podem ser vistos (Fig. 5.5B), além de retículo endoplasmático rugoso com cisternas isoladas e curtas (Fig. 5.4A-D; 5.5A e D). Cavéola é outra estrutura também visualizada nas HUVEC *in vitro* (Fig. 5.5F). Mitocôndrias longas foram de fácil observação (Fig. 5.5H) e, eventualmente, elementos do citoesqueleto puderam ser revelados (Fig. 5.5H).

Algumas vezes, junto ao Golgi, uma intensa vesiculação no citoplasma apresentando estruturas com características de corpúsculos de Weibel-Palade foram observadas, estando de acordo com a proposta da biogênese dos CWP, a partir da face trans do Golgi. O CWP nascente apresenta o conteúdo eletrólucido e a membrana envoltória ondulada (Fig. 5.6A). Na sequência, essa prancha mostra os diferentes aspectos da maturação dos CWP: corpúsculos imaturos com a matriz de baixa eletrondensidade (Fig. 5.6B), corpúsculos mais maduros apresentando matriz mais eletrondensa e com aspecto estriado, que corresponde aos túbulos que contém o Fator von Willebrand (Fig. 5.6A e B – detalhe em maior aumento em C). A Figura 5.6D representa uma visão em menor aumento de uma célula endotelial onde se observam CWP imaturos e maduros. Diferentes perfis de CWP são identificados na Figura 5.5E no seu estágio mais maduro, assim como na figura 5.6F. Algumas imagens sugestivas de estágios avançados de maturação dos CWP podem ser observadas na Fig. 5.7A-G. Alinhamento paralelo de dois CWP para posterior fusão, que é um dos processos já bem estabelecidos durante a maturação dos corpúsculos (Fig. 5.7A). Dois exemplos do estabelecimento da fusão entre dois CWP resultando na visualização de desorganização dos túbulos nesses corpúsculos imaturos, gerando uma morfologia alterada (Fig. 5.7B e C). Durante a ativação da célula endotelial, os

corpúsculos liberaram seu conteúdo por um processo de exocitose. Ocorre o deslocamento, então, dos CWP em direção à periferia da membrana plasmática da HUVEC (Fig. 5.7C e D) e se estabelece contato estreito entre as duas membranas para permitir a sua fusão e a conclusão do processo de exocitose (Fig. 5.7E-G). Outro aspecto que chamou nossa atenção foi a presença de estruturas próximas à membrana plasmática, com características de CWP imaturos, revestidos por clatrina, cujo conteúdo parece ser exocitado (Fig. 5.8 A-D).

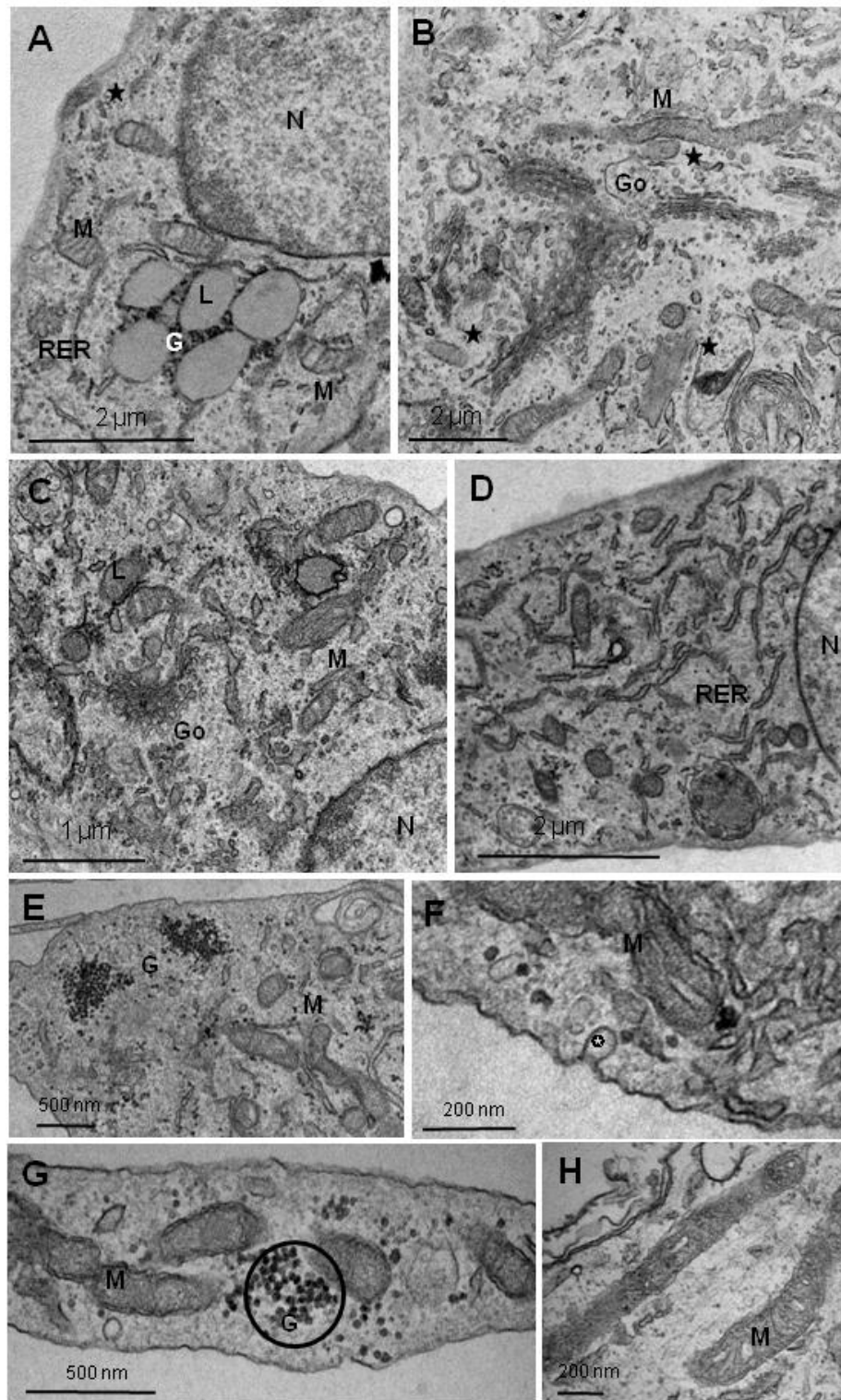


Fig. 5.5 - Aspectos morfológicos revelados pela ultraestrutura. Corpúsculos lipídicos próximos ao núcleo da célula e glicogênio, além do Retículo endoplasmático rugoso, diversas mitocôndrias e o CWP localizado próximo à membrana plasmática (A). O Golgi proeminente (B e C). Retículo endoplasmático bem evidente em (D) e Ilhas de glicogênio (D e G), Citoesqueleto em (H). Corpúsculos lipídicos (L); núcleo da célula (N); glicogênio (G); Retículo endoplasmático rugoso (RER); mitocôndrias (M); CWP (★); Golgi; Glicogênio (G)

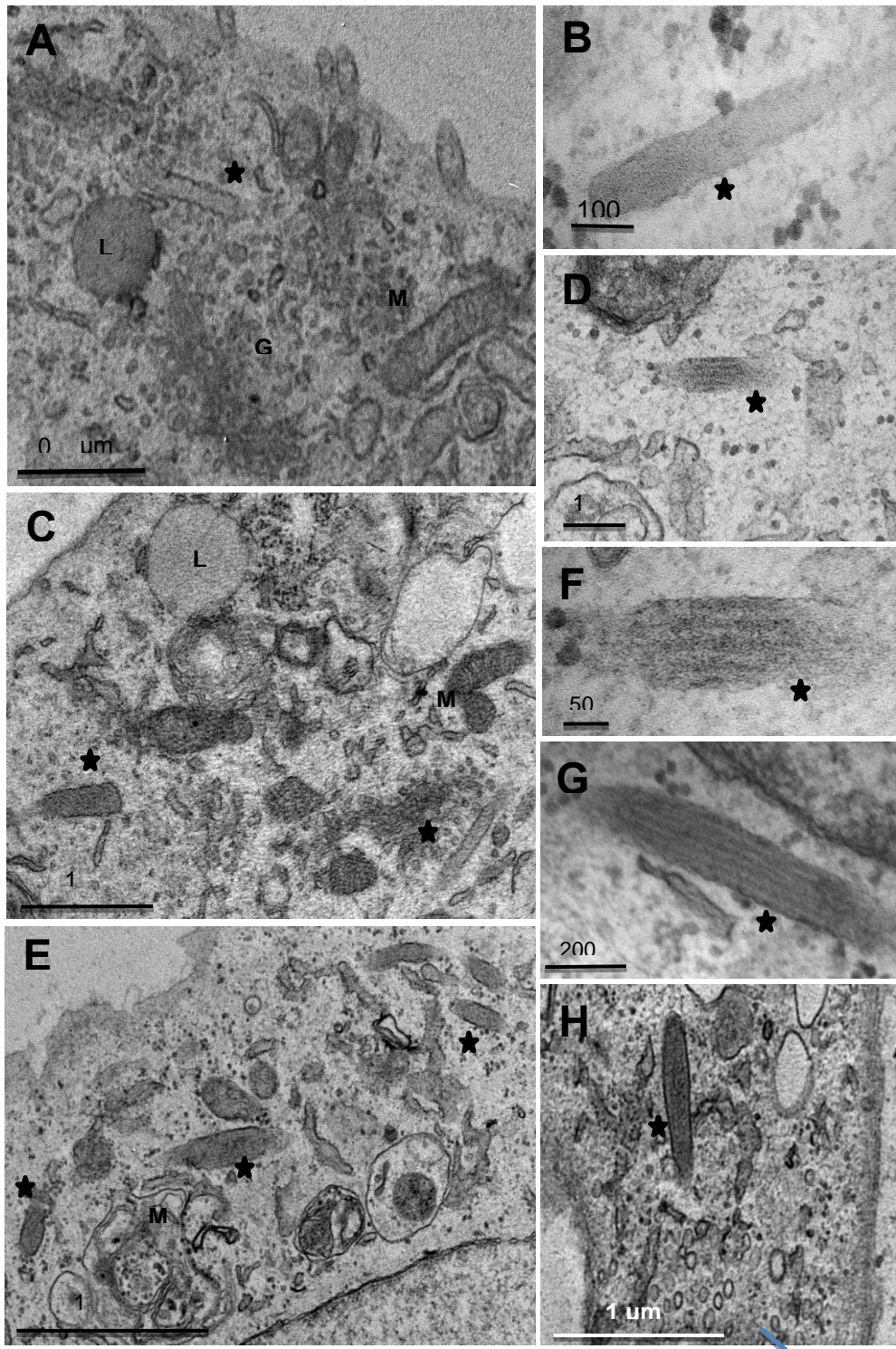


Fig. 5.6 - Ultraestrutura dos corpúsculos de Weibel-Palade. Imagens indicativas da biogênese do corpúsculo de Weibel Palade (★) próxima ao Golgi (A), Corpúsculos em diferentes estágios do amadurecimento e dispersos no citoplasma (C e H).

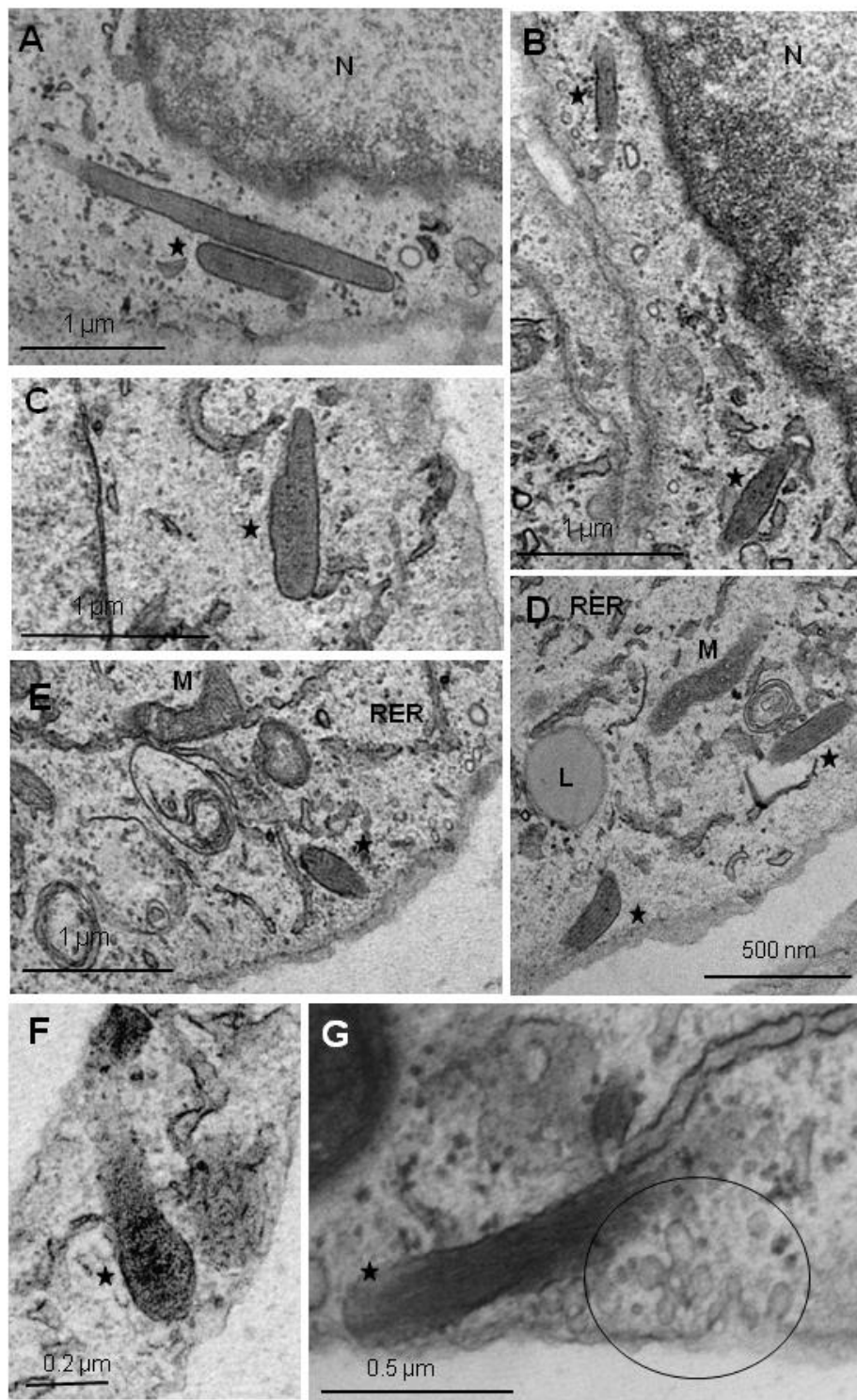


Fig. 5.7 - Aspectos dos corpúsculos de Weibel Palade em HUVEC. Os corpúsculos de Weibel Palade (★) alinhados (A), próximos ao núcleo (B) e a Fusão de dois CWP (C) CWP próximo à membrana plasmática (D - G).

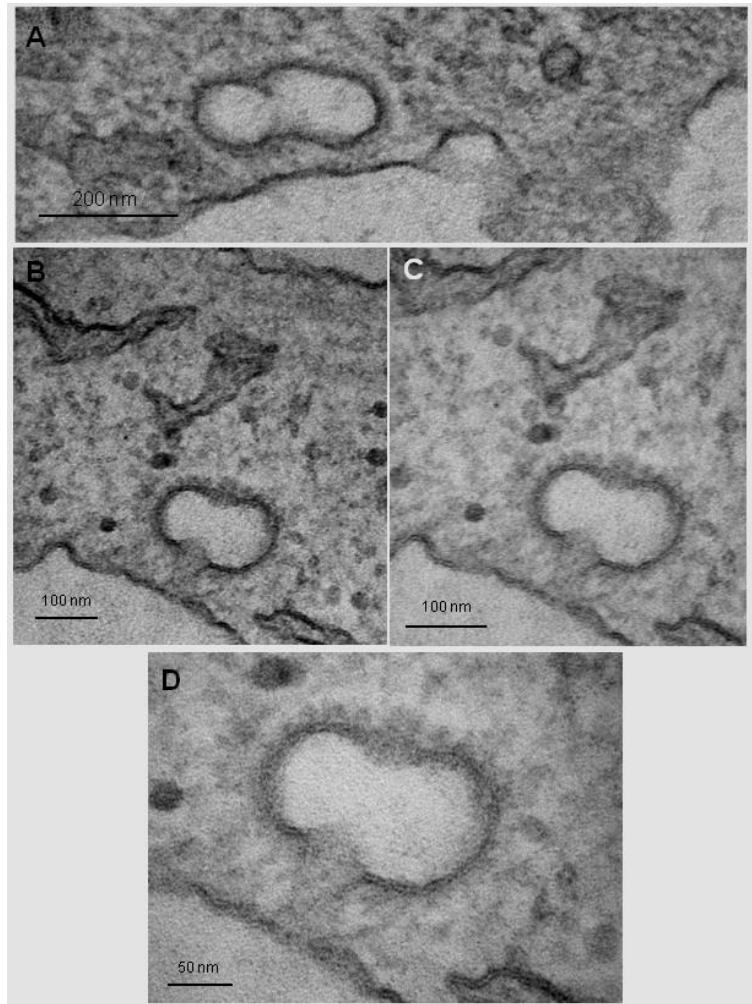


Fig. 5.8- Vesícula sugestiva de CWP revestida de clatrina. Estrutura com características comuns aos corpúsculos de WP localizada próxima à membrana (A). Abertura na membrana da vesícula e ausência de conteúdo no interior da estrutura vesicular, (B, C e D).

5.2 Análise da infectividade de taquizoítos em HUVEC das cepas ME-49 (WT e GFP) e RH de *T. gondii* obtidos de células Vero

Atendendo ao objetivo 2.1, esse estudo visou a avaliação da permissividade da infecção de HUVEC frente a duas cepas polares de *T. gondii* (ME-49 e RH, perfis avirulento e virulento, respectivamente). Os ensaios consideraram algumas variáveis: diferentes cargas parasitárias e análise comparativa da infecção de taquizoítos recolhidos do sobrenadante das culturas de manutenção (células Vero) e por meio da lise dessas células, num estudo cinético de 24-72 h. Além disso, outros parâmetros também foram avaliados: a capacidade de re-infecção dessas células (número de vacúolos parasitóforos (VP) por célula infectada versus tempo de interação), a proliferação celular (número de parasitos por VP temporal) e o destino intracelular do parasito (ciclo lítico e cistogênese).

5.2.1 Análise comparativa da interação de taquizoítos de *T. gondii* da cepa avirulenta ME-49, obtidos do sobrenadante ou pela lise mecânica de células VERO, frente às culturas de HUVEC.

O desenho experimental consistiu em utilizar taquizoítos obtidos do sobrenadante das culturas Vero no período de 4-6 dias de infecção, quando vários ciclos líticos eram estabelecidos, liberando os parasitos no meio extracelular. A outra metodologia foi recolher os taquizoítos a partir da lise mecânica das células Vero infectadas por igual período de tempo. Associado ao método de obtenção dos taquizoítos, foram testadas duas diferentes cargas parasitárias, visando verificar se a carga parasitária exerceria influência na infectividade e no destino intracelular do parasito. Após duas horas de contato com o parasito, as culturas foram lavadas e fixadas para coloração por panótico nos períodos de 24, 48 e 72 h de interação. Nossos resultados utilizando a cepa avirulenta ME-49 de parasitos recolhidos do sobrenadante de células Vero demonstraram que, com as relações parasito/HUVEC utilizadas (5:1 ou 10:1), a infecção foi baixa (cerca de 10 e 16%) na relação 10:1 com 48 e 72 h de interação, respectivamente (Fig. 5.9A). Embora com baixa infectividade, houve diferenças significantes entre as cargas

parasitárias e com relação ao tempo de interação entre as 2 cargas (Fig. 5.9A). Nos ensaios com taquizoítos recolhidos de culturas Vero por lise mecânica, observamos um aumento considerável na capacidade de invasão desses parasitos, chegando a alcançar cerca 70% de células infectadas nas 72 h de interação, independente da carga parasitária (Fig. 5.9B). A relação parasito-célula também apresentou diferença significativa ao longo dos três tempos de interação (Fig. 5.9B). Comparando os dois protocolos experimentais, os parasitos da cepa ME-49 obtidos da lise mecânica foram cerca de 76, 82 e 85% mais infectivos nas 24, 48 e 72 h de interação, respectivamente na relação 5:1 daqueles recolhidos do sobrenadante (Fig. 5.9A e B). Índices altos também foram obtidos na relação parasito/célula de 10:1 que, na média dos tempos de interação, foi de 79% mais infectivo nos taquizoítos obtidos do lisado.

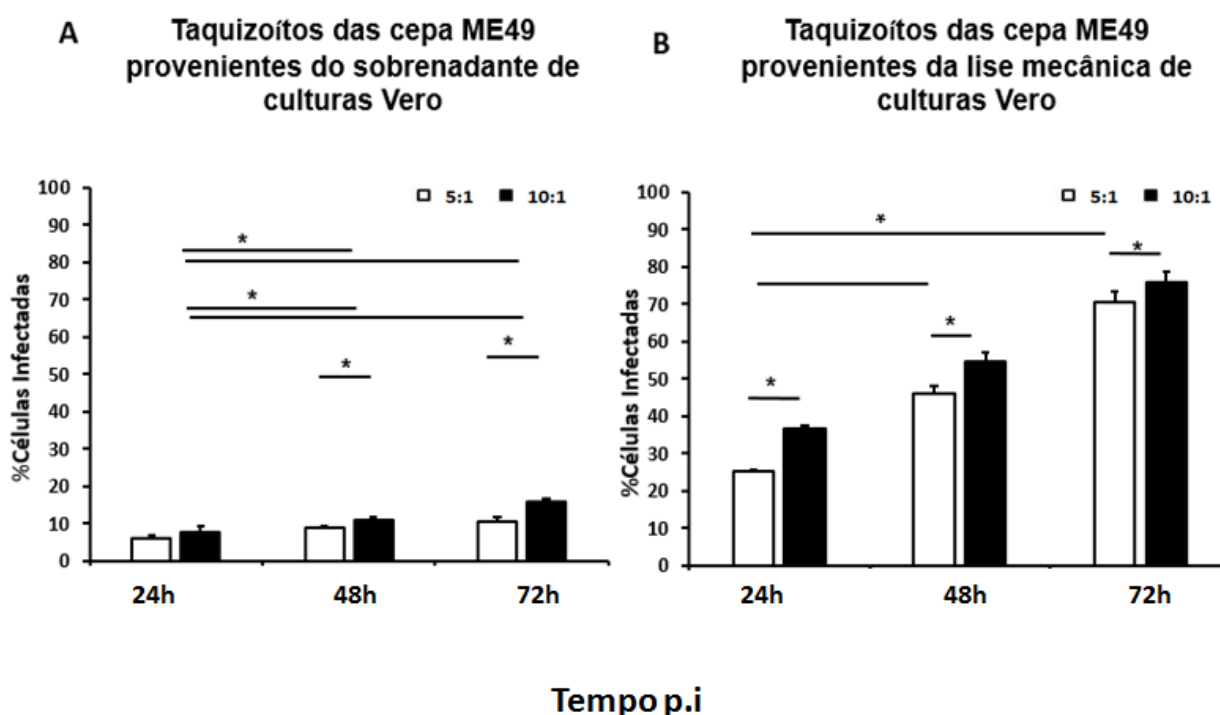


Fig. 5.9 - Análise da porcentagem de HUVEC infectadas ao longo de 24, 48 e 72 h por taquizoítos da cepa ME49 de *T. gondii*. Gráficos dos ensaios utilizando parasitos recolhidos do sobrenadante (A) e parasitos obtidos por lise (B). $n = 3$ experimentos

A análise quantitativa do número de vacúolos por célula e o monitoramento do número de parasito por vacúolo, nos ensaios com parasitos obtidos do

sobrenadante, demonstrou que após 24 h predominam células contendo um vacúolo com 1-2 parasitos em ambas as cargas parasitárias, em torno de 70%. A partir de 48 h, foi observado um maior número de parasitos no interior dos vacúolos parasitóforos, indicando a multiplicação celular, que fica mais evidente com 72 h de infecção, atingindo valores de 80-90% de células contendo 5 ou mais parasitos (Tabelas 1 e 2A e B). Podemos inferir desse modo que não houve diferença na susceptibilidade das células de re-infecções nem na capacidade multiplicativa desses parasitos em HUVEC.

Imagens representativas da infecção de HUVEC com taquizoítos da cepa ME-49 recolhidos do sobrenadante estão na figura 5.10 A, C e E, com carga parasitária de 5:1, e na figura 5.10 B, D e F, na relação 10:1. Com 24 h demonstramos a predominância de células com um vacúolo contendo 1-2 parasitos, (Fig. 5.10A e B). A interação de 48 h detecta vacúolos parasitóforos contendo mais de 5 parasitos (Fig. 5.10 C e D), indicativo de ativa multiplicação celular, que progride com 72 h mostrando mais de 5 parasitos no interior dos vacúolos (Fig. 5.10E e F).

A				B			
Tempo p.i	24 h	48 h	72 h	Tempo p.i	24 h	48 h	72 h
1 VP	70 ± 2	70 ± 3	87 ± 2.5	1 VP	71 ± 2.5	68 ± 2	90 ± 2
2 VP	23 ± 1.5	26 ± 2.5	10 ± 1	2 VP	25 ± 3	30 ± 1.5	9 ± 1
3-4 VP	7 ± 3	4 ± 1.5	0 ± 2	3-4 VP	3 ± 1.5	2 ± 1	1 ± 1
≥5 VP	0 ± 1	0 ± 1.5	3 ± 2	≥5 VP	1 ± 2.5	0 ± 2	0 ± 2

Tabela 1. Análise da porcentagem de vacúolos por célula infectada ao longo da cinética de infecção com taquizoítos da cepa ME49 de *T. gondii* obtidos de sobrenadante. Número de vacúolos encontrados utilizando a relação 5:1 (A) e 10:1 (B).

A				B			
Tempo p.i	24 h	48 h	72 h	Tempo p.i	24 h	48h	72 h
1P	8 ± 1.5	6 ± 2.5	3 ± 2.5	1P	14 ± 2.5	6 ± 3	5 ± 2.5
2P	42 ± 2	6 ± 3.5	5 ± 2	2P	33 ± 3	4 ± 1.5	3 ± 1.5
3-4 P	30 ± 4	8 ± 4	0 ± 1	3-4 P	37 ± 4	10 ± 2.5	2 ± 1
≥5 P	20 ± 1.5	80 ± 1.5	92 ± 2.5	≥5 P	16 ± 1.5	80 ± 3	90 ± 2.5

Tabela 2. Análise da porcentagem de parasitos por vacúolos ao longo da cinética de infecção com taquizoítos da cepa ME49 obtidos de sobrenadante de culturas VERO. Número de vacúolos encontrados utilizando a relação 5:1 (A) e 10:1 (B).

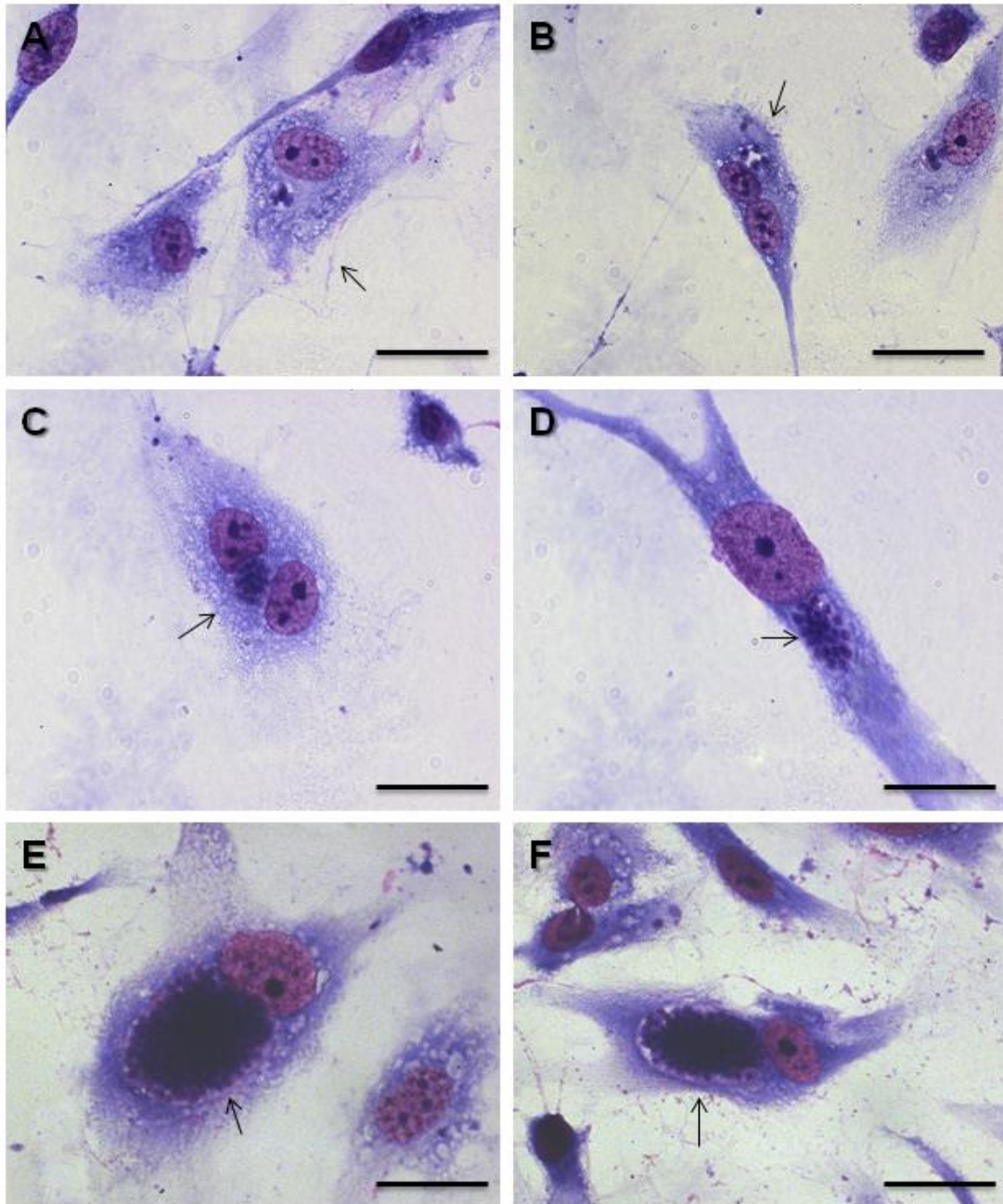


Fig. 5.10 - Aspectos da infecção de taquizoítas da cepa ME-49 de *T. gondii* recolhidos de sobrenadante das culturas VERO, em culturas primárias HUVEC. Pode-se observar um vacúolo parasitóforo (VP) contendo três e quatro parasitos em A (5:1) e B (10:1). Com 48 horas de infecção, observam-se vacúolos com mais de 10 parasitos em C (10:1) e D (5:1), com 72 horas de infecção, maior número de parasitos no interior do VP, como mostrado em E (10:1) e F (5:1) [Barra= 50 μ m]

Além do maior número de células infectadas nos ensaios utilizando parasitos provenientes da lise das células, com 24 h observamos também o maior número de vacúolos por célula, predominando células com 3 e 4 vacúolos contendo entre 3 e 4 parasitos (Fig. 5.11A e B), o que confirma a maior capacidade infectiva desses parasitos comparados aos recolhidos do sobrenadante, em ambas as relações utilizadas. Com 48 h (Fig. 5.11C e D) e 72 h (Fig. 5.11E e F) nota-se um aumento significativo de células contendo um único vacúolo (Tabela 3A e B), indicativo de que está ocorrendo novas infecções no período de 72 h, como produto do rompimento de células nas quais, o parasito concluiu o ciclo lítico. A multiplicação do parasito é evidenciada pelo aumento do número de parasitos no vacúolo parasitóforo ao longo do tempo de infecção (Tabela 4A e B).

A				B			
Tempo p.i	24 h	48 h	72 h	Tempo p.i	24h	48H	72h
1VP	30 ± 1.5	32 ± 1.5	40 ± 3	1VP	30 ± 1,5	30 ± 1.5	36 ± 2.5
2VP	26 ± 4	29 ± 2	19 ± 2	2VP	25 ± 3,5	31 ± 1	30 ± 1.5
3-4 VP	36 ± 1	30 ± 1	31 ± 5	3-4 VP	41 ± 2	32 ± 2.5	26 ± 2.5
≥5 VP	8 ± 1	9 ± 1.5	10 ± 1	≥5 VP	4 ± 1.5	7 ± 1.5	8 ± 1

Tabela 3. Análise da porcentagem de vacúolos por célula infectada ao longo da cinética de infecção com taquizoítos da cepa ME49 de *T. gondii* obtidos pela lise de culturas VERO. Número de vacúolos encontrados utilizando a relação 5:1 (A) e 10:1 (B).

A				B			
Tempo p.i	24 h	48h	72 h	Tempo p.i	24h	48H	72h
1P	49 ± 2	10 ± 1	6 ± 1	1P	24 ± 4	10 ± 1	7 ± 1
2P	19 ± 2.5	14 ± 3	6 ± 0.5	2P	16 ± 2	10 ± 1	9 ± 1.5
3-4P	28 ± 2	11 ±	7 ± 2	3-4P	54 ± 2	7 ± 1.5	7 ± 0.5
≥5 P	4 ± 2	65 ±	81 ±	≥5 P	6 ± 2	73% ± 6	77 ± 1.5

Tabela 4 - Análise da porcentagem de parasitos por vacúolos ao longo da cinética de infecção com taquizoítos da cepa ME49 de *T. gondii* obtidos pela lise de culturas VERO. Número de vacúolos encontrados utilizando a relação 5:1 (A) e 10:1 (B).

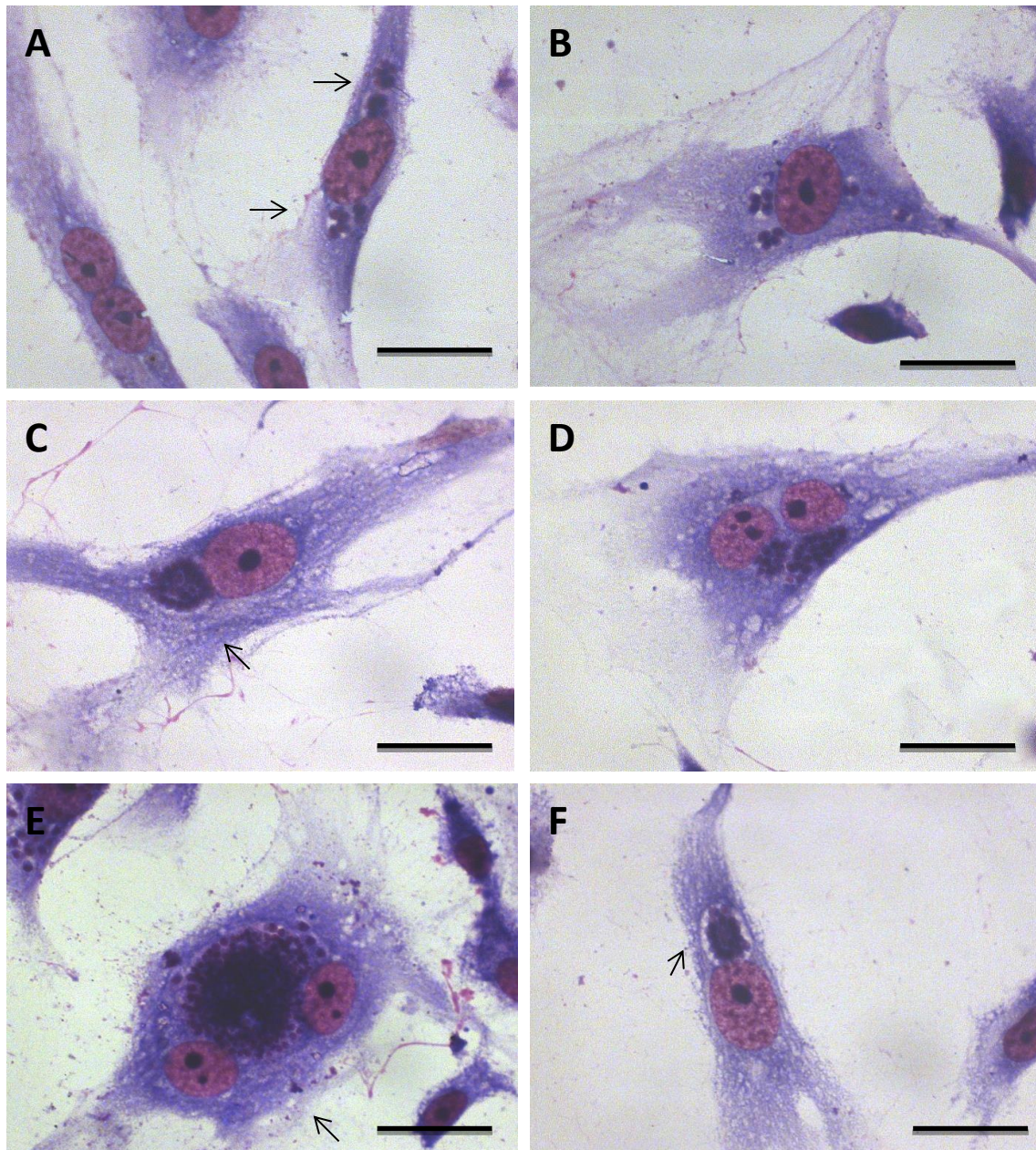


Fig. 5.11 - Aspectos da infecção de taquizoítas da cepa ME49 obtidos por lise das culturas VERO, em culturas primárias HUVEC. Pode-se observar quatro vacúolos parasitóforos (VP) contendo três e quatro parasitos em A (5:1) e B (10:1). Com 48 horas de infecção, observam-se vacúolos com mais de 10 parasitos em C (10:1) e D (5:1), com 72 h de infecção, maior número de parasitos no interior do VP, como mostrado em E (10:1) e F (5:1) [Barra= 50 μ m]

5.2.2 Análise comparativa da interação de taquizoítos de *T. gondii* da cepa virulenta RH, obtidos do sobrenadante ou pela lise mecânica de células VERO, frente às culturas de HUVEC.

Inicialmente, realizamos um ensaio com a cepa RH provinda do sobrenadante de células Vero com as cargas 5:1 e 10:1, a fim de comparar a capacidade infectiva dessa cepa com a ME-49. No entanto, a infecção com essa alta carga parasitária levou à intensa lise das culturas, impossibilitando, assim, o estudo cinético da infecção por tempos prolongados, como 48 e 72 horas. Desta forma, para atingir ao objetivo proposto no trabalho, utilizamos a carga parasitária 1:5 e 1:10 e as culturas foram lavadas após 2 horas de contato com o parasito. Nossos resultados demonstram que esses parasitos foram capazes de infectar 59% das HUVEC após 24 horas de interação com a carga parasitária 1:5 e 49% com a carga 1:10. O período de 48 horas de interação levou a uma infecção de 72% (1:5) e 63% (1:10), enquanto na interação de 72 horas, a porcentagem de células infectadas foi de 81% e 70% (1:5 e 1:10, respectivamente) (Fig. 5.12A).

Para avaliar se taquizoítos da cepa RH obtidos da lise mecânica das células Vero também influenciava na infecção de HUVEC, realizamos ensaios com as mesmas relações empregadas com os recolhidos do sobrenadante 1:5 e 1:10 (parasito/célula). Os dados gerados desses ensaios apontam 34% e 18% de células infectadas nas relações 1:5 e 1:10, respectivamente, com 24 h de interação. Ao longo do tempo houve aumento do número de células infectadas para 53 e 44% com 48 h e de 70 e 62% com 72 h de infecção, nas relações 1:5 e 1:10, respectivamente (Fig 5.12). Durante todos os tempos e relações, há um predomínio de células contendo um vacúolo, o que indica que está ocorrendo a infecção de novas células e que as células já infectadas permanecem suscetíveis a novas infecções (Tabelas 7 A e B), assim como a multiplicação dos parasitos (Tabela 8 A e B).

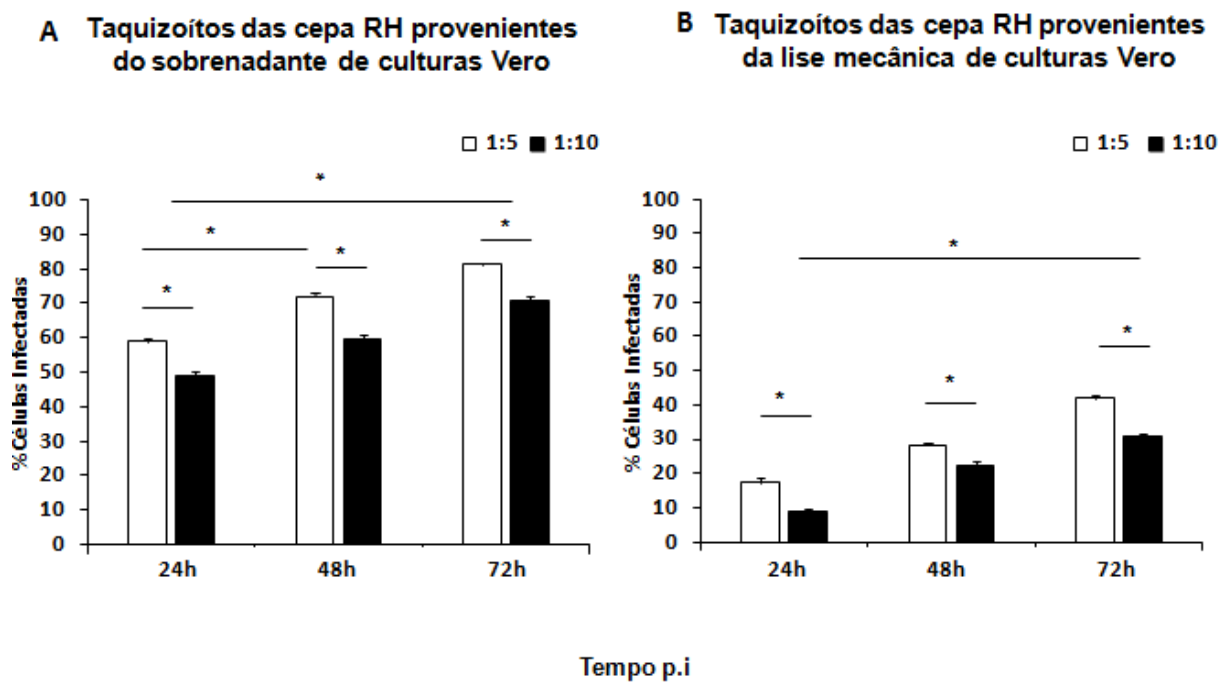


Fig. 5.12- Análise da percentagem de células HUVEC infectadas ao longo de 24, 48 e 72 h por taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*. Representado no gráfico ensaios utilizando parasitos recolhidos do sobrenadante (A) e parasitos obtidos por lise (B). *n* = 3 experimentos.

O número de vacúolos e de parasitos intravacuolares com um vacúolo parasitóforo, durante a infecção com o sobrenadante da cepa RH, aumentou ao longo do período de observação em ambas as cargas parasitárias (Tabela 5A e B). A quantificação mostrou que nos ensaios utilizando a carga 1:5, como esperado, esse aumento é ainda maior, como resultado da reinfecção de células previamente infectadas a partir de 48 h. A análise quantitativa de parasitos nos VP mostra o aumento de vacúolos contendo seis ou mais parasitos ao longo do tempo de infecção, em ambas as cargas parasitárias, mostrando a intensa multiplicação celular (Tabela 6A e B), evidência verificada em ambas as cargas parasitárias.

Imagens representativas da infecção de HUVEC com taquizoítos da cepa RH recolhidos do sobrenadante estão na figura 5.13A, C e E, com carga parasitária de 1:5, e na figura 5.13B, D e F, na relação 1:10. Com 24 h, demonstramos a predominância de mais de um vacúolo parasitóforo por célula contendo 3-4 parasitos, (Fig. 5.13A e B). As imagens representativas da interação de 48 h demonstram o aumento de vacúolos parasitóforos e a multiplicação celular dos parasitos (Fig. 5.13C e D). Com 72 h, observamos grande quantidade de parasitos no interior dos vacúolos (Fig. 5.13E e F).

A	Tempo	24 h	48 h	72 h	B	Tempo	24 h	48 h	72 h
	p.i					p.i			
	1 VP	10 ± 2.5	20 ± 3	60 ± 2		1 VP	15 ± 2.5	28 ± 2	40 ± 1.5
	2 VP	25 ± 1.5	30 ± 1.5	20 ± 1		2 VP	53 ± 1.5	26 ± 2	39 ± 2.5
	3-4 VP	58 ± 3.5	37 ± 2	12 ± 1.5		3-4 VP	23 ± 1	3 ± 3	13 ± 3
	≥5 VP	7 ± 4	13 ± 3	8 ± 2.5		≥5 VP	9 ± 2.5	9 ± 1.5	8 ± 2

Tabela 5 - Análise da porcentagem de vacúolos por célula infectada ao longo da cinética de infecção com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* obtidos de sobrenadante. Número de vacúolos encontrados utilizando a relação 1:5 (A) e 1:10 (B).

A	Tempo	24 h	48h	72 h	B	Tempo	24 h	48 h	72 h
	p.i					p.i			
	1P	10 ± 2	6 ± 1.5	5 ± 1		1P	10 ± 2	6 ± 2	6 ± 4
	2P	16 ± 2.5	10 ± 3	16 ± 2		2P	14 ± 3	10% ± 1.5	10 ± 1.5
	3-4 P	22 ± 2	14 ± 1	10% ± 2		3-4 P	20 ± 1.5	16 ± 2.5	14 ± 3
	≥5 P	52 ± 2	70% ± 5	69 ± 2.5		≥5 P	56 ± 4	68 ± 3	70 ± 1

Tabela 6 - Análise da porcentagem de parasitos por vacúolos ao longo da cinética de infecção com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* obtidos de sobrenadante. Número de vacúolos encontrados utilizando a relação 1:5 (A) e 1:10 (B).

A				B			
Tempo p.i	24 h	48 h	72 h	Tempo p.i	24h	48H	72h
1 VP	60 ± 2.5	50 ± 1	55 ± 3	1 VP	75 ± 2	60 ±	66 ± 2.5
2 VP	25 ± 4	20 ± 1.5	15 ± 2.5	2 VP	16 ± 2.5	25 ± 2	18 ± 1.5
3-4 VP	10 ± 3	27 ± 2.5	22 ± 4	3-4 VP	9 ± 2	15 ± 1.5	13 ± 1.5
≥5 VP	4 ± 2	3 ± 1	8 ± 3	≥5 VP	0 ± 2	0 ± 1	3 ± 2

Tabela 7- Análise da porcentagem de vacúolos por célula infectada ao longo da cinética de infecção com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* obtidos pela lise das culturas VERO. Número de vacúolos encontrados utilizando a relação 1:5 (A) e 1:10 (B).

A				B			
Tempo p.i	24 h	48 h	72 h	Tempo p.i	24 h	48 h	72 h
1P	20 ± 2	4 ± 1.5	8 ± 1	1P	60 ± 4	3 ± 1	8 ± 1.5
2P	27 ± 2	20 ± 3	15 ± 0.5	2P	25 ± 2	20 ± 3	12 ± 0.5
3-4P	40 ± 2	26 ± 1	22 ± 2	3-4P	10 ± 2	27 ± 1	20 ± 2
≥5P	13 ± 2	50 ± 5	55 ± 1	≥5P	5 ± 2	50 ± 2	60 ± 2.5

Tabela 8 - Análise da porcentagem de parasitos por vacúolos ao longo da cinética de infecção com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* obtidos pela lise das culturas VERO. Número de vacúolos encontrados utilizando a relação 1:5 (A) e 1:10 (B)

Imagens representativas da infecção de HUVEC com taquizoítos da cepa RH recolhidos do sobrenadante estão na figura 5.13A, C e E, com carga parasitária de 1:5, e na figura 5.13B, D e F, na relação 1:10. Com 24 h, demonstramos a predominância de mais de um vacúolo parasitóforo por célula contendo 3-4 parasitos, (Fig. 5.13A e B). As imagens representativas da interação de 48 h demonstram o aumento de vacúolos parasitóforos e a multiplicação celular dos parasitos (Fig. 5.13C e D). Com 72 h, observamos grande quantidade de parasitos no interior dos vacúolos (Fig. 5.13E e F).

Como demonstrado nas imagens representativas da infecção de HUVEC com taquizoítos da cepa RH obtidos por lise com a carga parasitária 1:5 (Figura 5.14A, C e E) e na relação 1:10 (Figura 5.15B, D e F). Após 24 h de infecção observamos a presença de um vacúolo parasitóforo por célula contendo 3-4 parasitos, (Fig. 5.14A e B). Em 48 h é possível ver o aumento do número de parasitos por vacúolo parasitóforo (Fig. 5.14C e D) que permanece após 72 h de infecção (Fig. 5.14E e F).

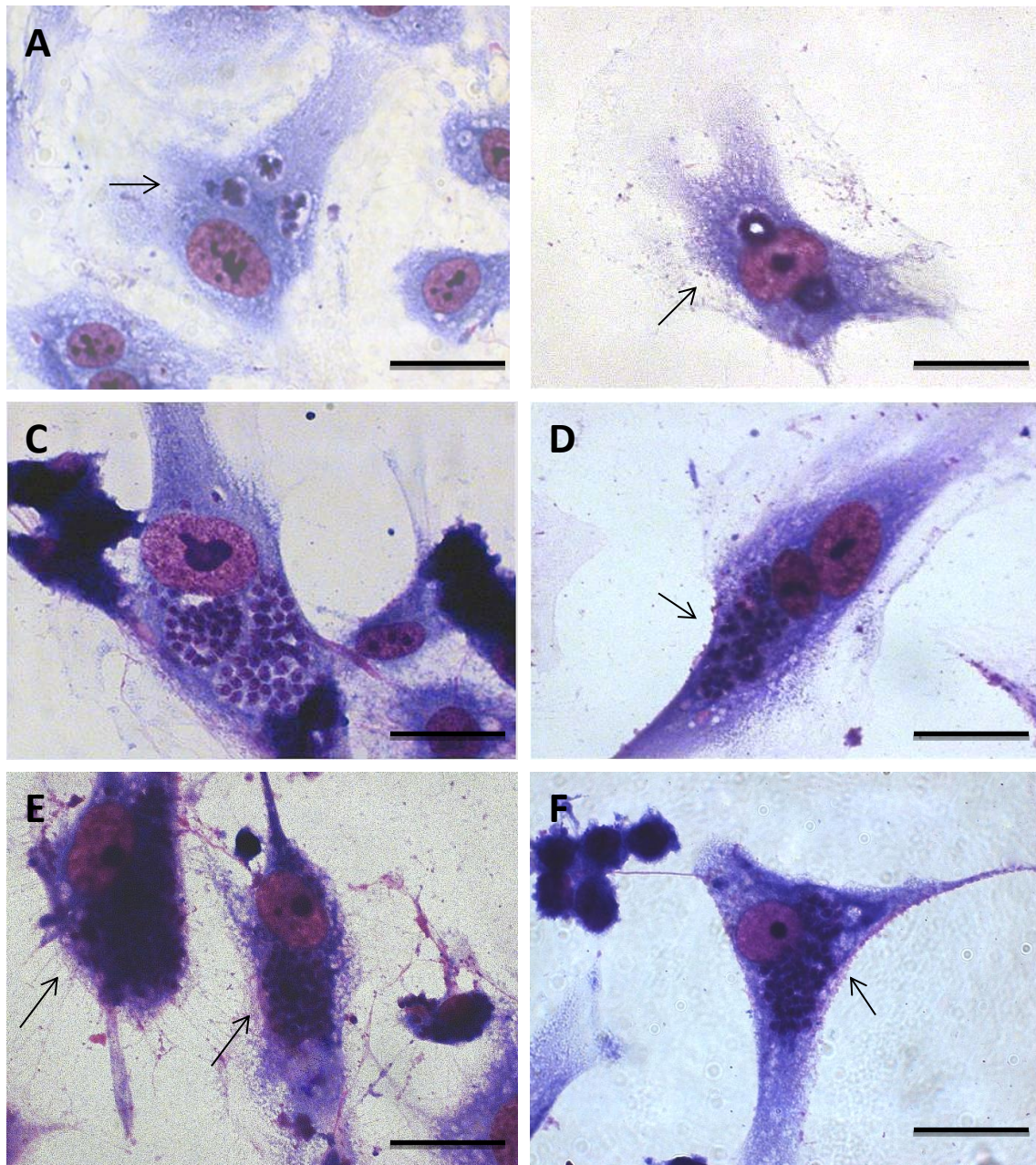


Fig. 5.13 - Aspectos de infecção de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* obtidos de sobrenadante em culturas primárias HUVEC. Após 24 h de infecção, podemos observar 3VP contendo 3 e 4 parasitos em A (1:5) e B (1:10). 48 h de infecção, observa-se 3 VPS contendo mais de cinco taquizoítas em C (1:5) e mais de 5 vacúolos parasitóforos contendo entre 3 e 4 taquizoítas em D (1:10); 72 h de infecção, 1 VP com grande quantidade de parasitos como mostrado em E (1:5) F (1:10) [Barra= 50 μ m]

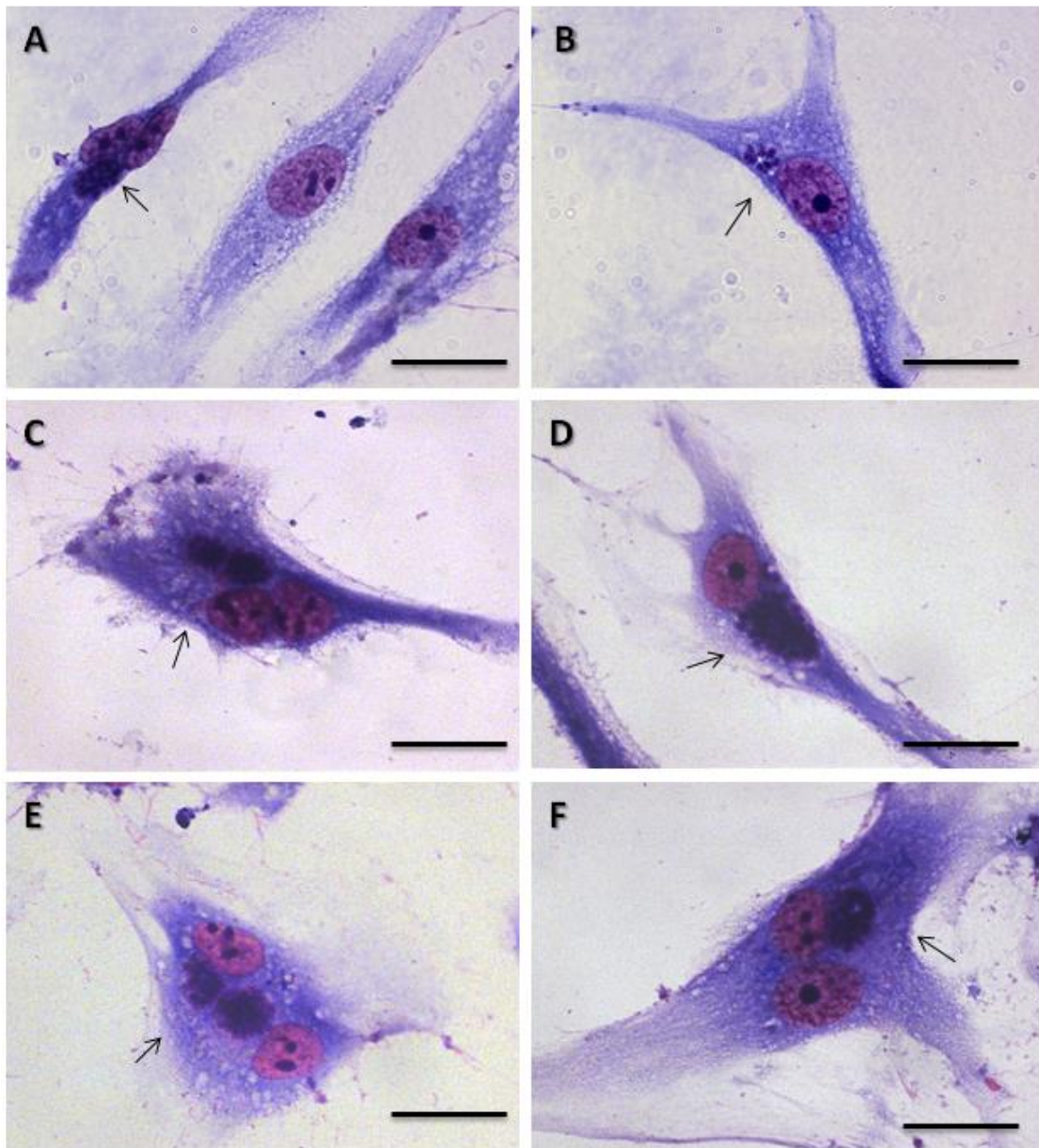


Fig. 5.14 - Cinética de infecção de tachizoítos da cepa RH obtidos por lise em culturas primárias HUVEC. Após 24 h de infecção, podemos observar um VP contendo 3 e 4 parasitos em A (1:5) e B (1:10). 48 h de infecção, observa-se dois VP contendo mais de seis tachizoítos em C (1:5) e 1 vacúolo parasitóforo contendo mais de seis tachizoítos em D (1:10); 72 h de infecção, VP com mais de 5 parasitos como mostrado em E (1:5) F (1:10) [Barra = 50 μ m]

Formas de obtenção de taquizoitos de <i>T. gondii</i> de culturas de células Vero		
Cepa	Sobrenadante	Lisado
ME-49 (WT)	+	+++
RH	+++	+

(+) Baixa infectividade; (+++) Alta infectividade.

Quadro 5.1 – Análise comparativa da capacidade infectiva de taquizoítos de *T. gondii* obtidos pelos diferentes métodos de obtenção dos parasitos de culturas Vero. Quadro demonstrativo dos resultados a cerca da diferença da capacidade de taquizoítos recolhidos do sobrenadante ou obtidos por lise.

5.3. ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DA INTERAÇÃO DE *T. GONDII* E HUVEC

Culturas primárias de HUVEC infectadas com taquizoítos da cepa ME-49 de *T. gondii* (relação 5:1 parasitos/célula hospedeira) foram observadas por MET após períodos que variaram entre 24 até 144 h de interação. Assim, esse longo período de análise mostrou a dinâmica dos vários eventos intracelulares que ocorrem simultaneamente, quer na mesma célula quanto no conjunto de células de um determinado período de análise. Esses eventos biológicos ocorrem tendo em vista que as células não são refratárias a novas infecções. Dessa forma, os dados vistos na avaliação quantitativa desta interação, se refletem na análise por MET. Células com um único vacúolo contendo um parasito ou com vários vacúolos com número de parasitos variável são constantemente observados já a partir de 48 h de interação parasito-HUVEC. Essas observações são decorrentes do ciclo lítico que se mantém ativo em grande parte das células infectadas a partir desse período. Esse conjunto de dados deverá ser descrito a seguir.

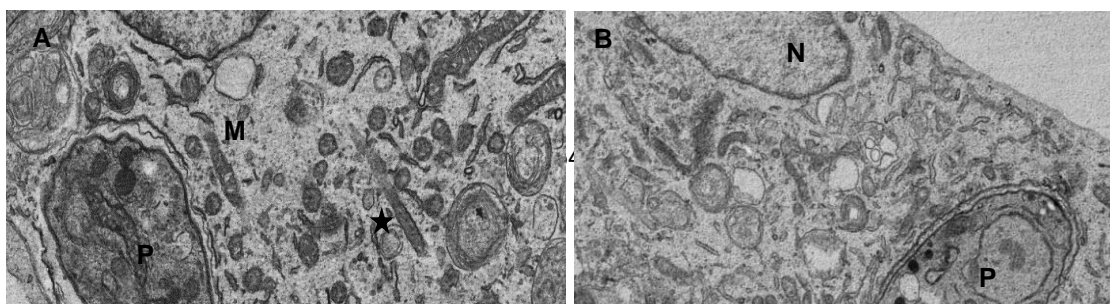
No período das primeiras 24 horas de interação *T. gondii*-HUVEC muitas células continham um único taquizoíto. A resposta celular à presença do parasito desencadeia um processo dinâmico de migração de organelas em torno do VP que se mantém ao longo da infecção (24-96 h) (Fig. 5.15A-E). Células com um ou dois VP no período de 24-96 h apresentam vários perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) revestindo o VP em associação estreita com a membrana do VP (MVP) e algumas vezes esse revestimento não foi contínuo, deixando desnudas algumas áreas da MVP (Fig. 5.15A-E; 5.16A-C; 5.17; 5.18A e B). A interação de RER à MVP ocorre via face lisa, ficando a face rugosa (com ribossomos) direcionada para o citoplasma da célula hospedeira (Fig. 5.16A-C; 5.17; 5.18A e B). Mitocôndrias circundando o VP e interagindo diretamente com a MVP, ou estabelecendo esse contato mediado pelo RER, foram vistas com frequência (Fig. 5.15C e E; 5.17; 5.18 A e B). Nota-se a presença de corpúsculos lipídicos (CL) durante a infecção de HUVEC e *T. gondii* que apresentam aspecto ligeiramente osmiofílico, forma arredondada e tamanhos variados (Fig. 5.15D e D'; 5.16B e C). Células com vacúolos repletos de parasitos conservaram a

interação com CL, por vezes interconectando dois vacúolos (Fig. 5.16B; 5.18A). Uma característica morfológica que nos chamou a atenção se relaciona à morfologia da MVP em HUVEC, que se apresenta bastante ondulada e a matriz vacuolar repleta de vesículas nos vacúolos frouxos (Fig. 5.15A, C-E; 5.162A e B). A presença de VP apertados mostra uma discreta rede túbulo-vesicular quando os vacúolos têm poucos parasitos (Fig. 5.15A, B e E). Independente do tipo de VP, observa-se sempre a migração de organelas associadas ou nas proximidades do VP (Fig. 5.15D e E; 5.17; 5.20B). Uma organela específica de células endoteliais, os CWP, mostram alta eletrondensidade em células infectadas (Fig. 5.17) e a dinâmica desses corpúsculos durante a sua ativação pode ser observada com as organelas se localizando perpendicularmente à membrana plasmática de HUVEC, num processo que antecede a sua exocitose (Fig. 5.18A). Imagem bastante sugestiva de exocitose de CWP em células infectadas pode ser vista na figura 5.19B.

Mais dois aspectos de migração e interação de estruturas e organelas pode ser observado em HUVEC contendo *T. gondii*: grânulos de glicogênio em grande quantidade são vistos no interior do VP (Fig. 5.19A, A' e B) e vários perfis de Golgi em estreita associação com os VP (Fig. 5.19A e C). Vacúolos em franco processo de divisão celular de taquizoítos e em processo de conclusão da endodiogenia (parasitos ainda com corpo residual) mantêm a associação com organelas (Fig. 5.16C; 5.18B; 5.20A-C; 5.21A, A' e B). Durante este processo há um aumento da síntese da RTV com concomitante aumento da matriz vacuolar e a manutenção da associação de organelas da célula hospedeira à MVP (Fig. 5.16C; 5.20A-C; 5.21A, A' e B). Outro aspecto observado foi a presença de algumas células com parasitos degradados que ainda mantinham a associação com organelas à MVP (Fig. 5.22A-C). Durante esse processo, a imagem de três células justapostas mostra que durante a infecção, pelo menos morfológicamente, não há alteração nas regiões de especialização da membrana de HUVEC (Fig. 5.22C). As imagens são representativas de um processo dinâmico que ocorre ao longo da infecção, não sendo restritas temporalmente.

Culturas infectadas por 96-144 h apresentaram células com parasitos exibindo características morfológicas compatíveis com formas bradizoítos, num

claro indicativo de que a conversão taquizoíto-bradizoíto se estabeleceu espontaneamente em HUVEC infectadas com a cepa ME-49 (Fig. 5.23A-D; 5.24 A e A'; 5.25A-C; 5.26A e B). A principal característica desses bradizoítos é a presença de grânulos de amilopectina em quantidades variáveis e, em alguns cortes, se pode observar o deslocamento do núcleo para a região posterior do corpo do parasito (Fig. 5.23A-D; 5.24A e A'; 5.25A-C; 5.26A e B). Algumas células apresentavam infecções múltiplas contendo vários vacúolos unitários (Fig. 5.23B e D; 5.24A e A'), bradizoítos únicos ou em duplas e aqueles em divisão (Fig. 5.23B-D; 5.24A e A'; 5.28C). A associação de CL e demais organelas, com muitos desses vacúolos em diferenciação permanece (Fig. 5.23A-D; 5.24A e A'; 5.25C). Em alguns desses vacúolos havia uma grande invaginação da MVP ocupando grande área do espaço vacuolar (Fig. 5.23A e D). Embora a maioria desses vacúolos com bradizoítos mantivesse a associação com organelas de HUVEC, alguns apresentavam a membrana com raros perfis de RER e mitocôndrias (Fig. 5.25A e B; 5.26.B'). É de surpreender que alguns vacúolos exibissem uma RTV exuberante, embora grande quantidade de bradizoítos pudesse ser detectada no seu interior (Fig. 5.25A e A'). À semelhança do que foi visto em vacúolos com taquizoítos, grânulos de glicogênio foram encontrados no interior de VP contendo bradizoítos (Fig. 5.24A e A'). Um dado adicional foi a manutenção da morfologia das áreas juncionais entre células de HUVEC durante a franca conversão de taquizoítos-bradizoítos (Fig. 5.24A e A'). Nos cortes ultrafinos analisados nós não fomos capazes de observar alterações da membrana do vacúolo como indícios de formação da parede cística. Eventualmente, bradizoítos foram encontrados no meio extracelular, provavelmente decorrentes do ciclo lítico em HUVEC onde a conversão estava se processando, e eram vacúolos com ambas as formas: taquizoítos e bradizoítos (Fig. 5.27).



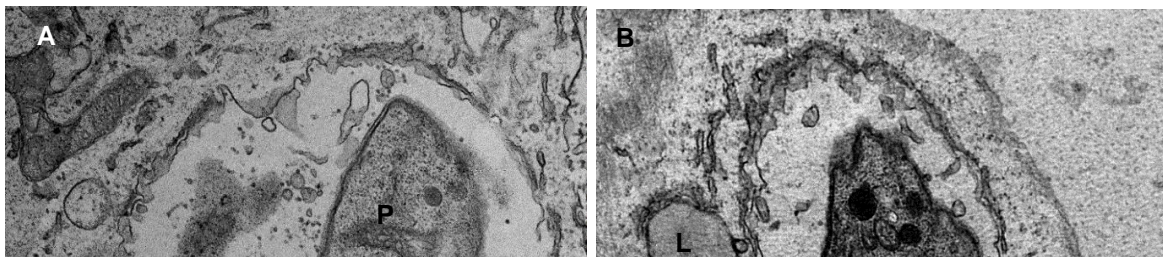
RER

RER

RER

RER

Fig. 5.15 - Aspectos ultraestruturais da interação de *T. gondii* e HUVEC. Organelas ao redor da membrana do VP (MVP) (A-E). CWP dispersos pelo citoplasma (★) (A) Corpúsculo lipídico associado ao VP (D e D'), mitocôndrias (A-E) e RER (A-E). Dois vacúolos parasitóforos no interior de HUVEC com interação de organelas (E).



RER

RER

RER

Fig. 5.16 - Associação de organelas à membrana do vacúolo parasitóforo de *T. gondii* em HUVEC. Discreta RTV em vacúolo contendo um parasito (A). Associação de corpúsculos lipídicos a MVP (B e C) e de RER (A-C).

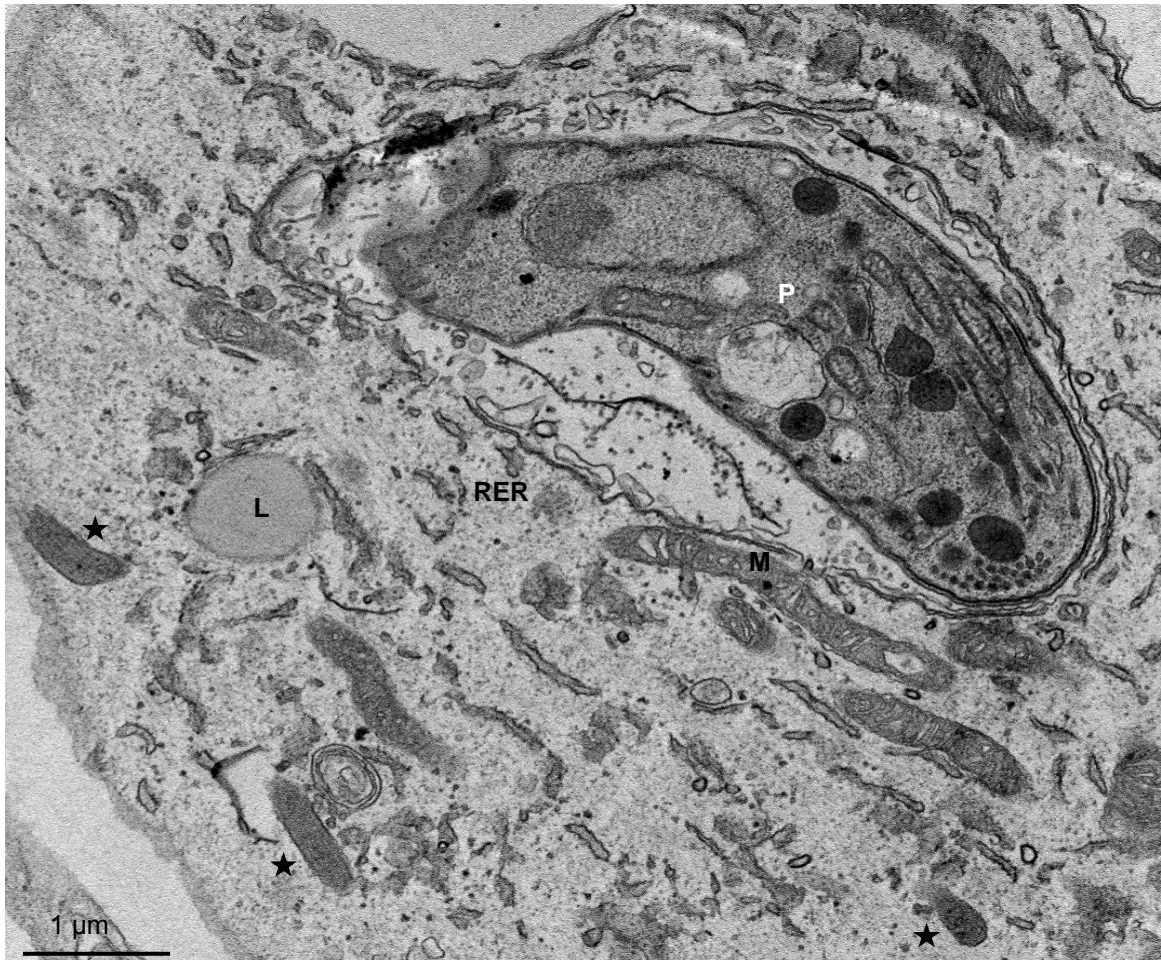
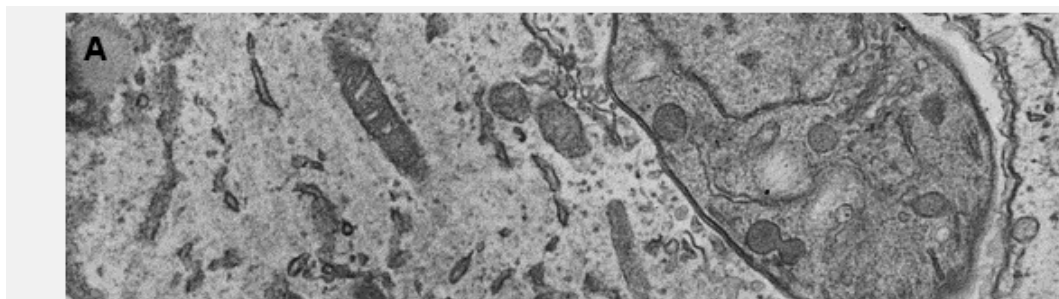


Fig. 5.17 - Aspectos ultraestruturais da interação de *T. gondii* e HUVEC. CWP eletrondensos (★), associação de mitocôndria a MVP.



P

M

RER

M

RER

P

Fig. 5.18 - Aspectos ultraestruturais da interação de *T.gondii* e CWP em HUVEC. CWP eletrondenso organizados em paralelamente no interior da HUVEC infectada (★) (A) CWP na membrana da célula infectada, indicando exocitose (B).

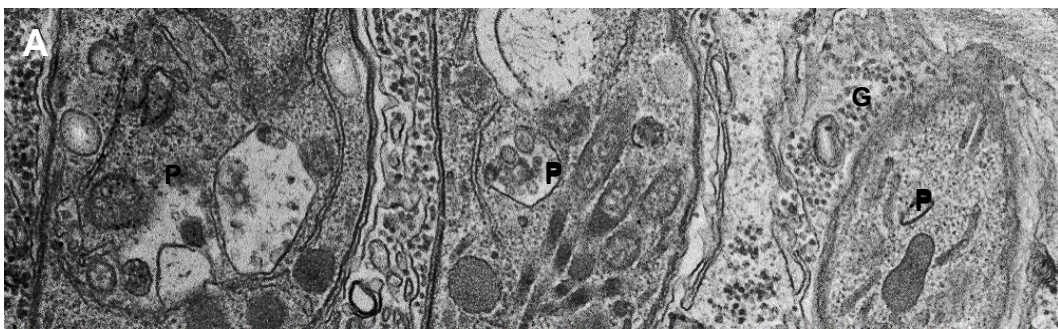


Fig 5.19 - Aspectos ultraestruturais da interação de *T. gondii* e perfis de Golgi em HUVEC. Grande quantidade de grânulos de glicogênio interior do VP (A' e B) e inúmeros perfis de Golgi em estreita associação com os VP (A -D).

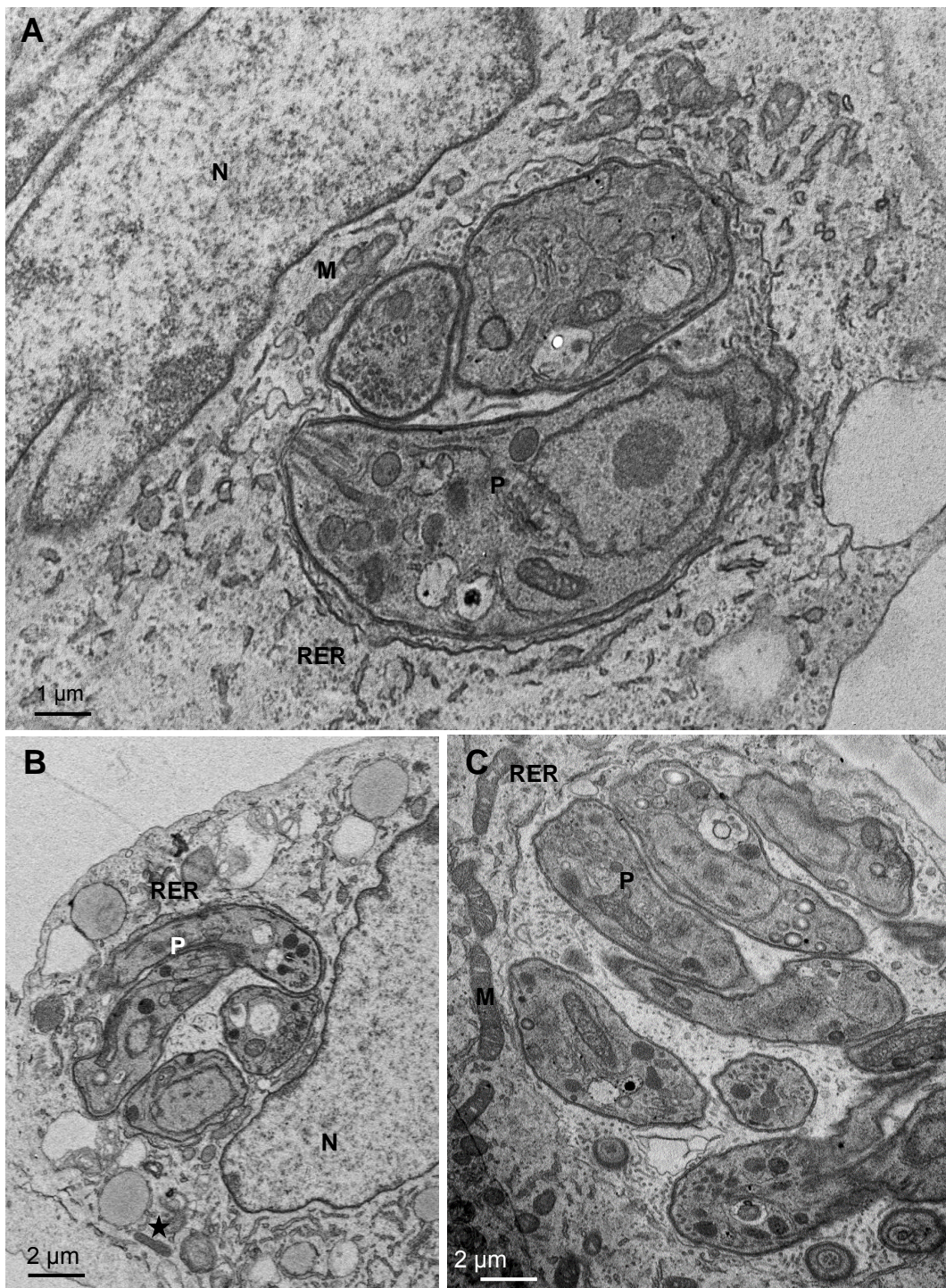


Fig. 5.20 - Aspectos ultraestruturais da divisão celular de *T. gondii* e HUVEC. Associação de organelas durante o processo de divisão celular de taquizoítos por endodiogenia (A-C).

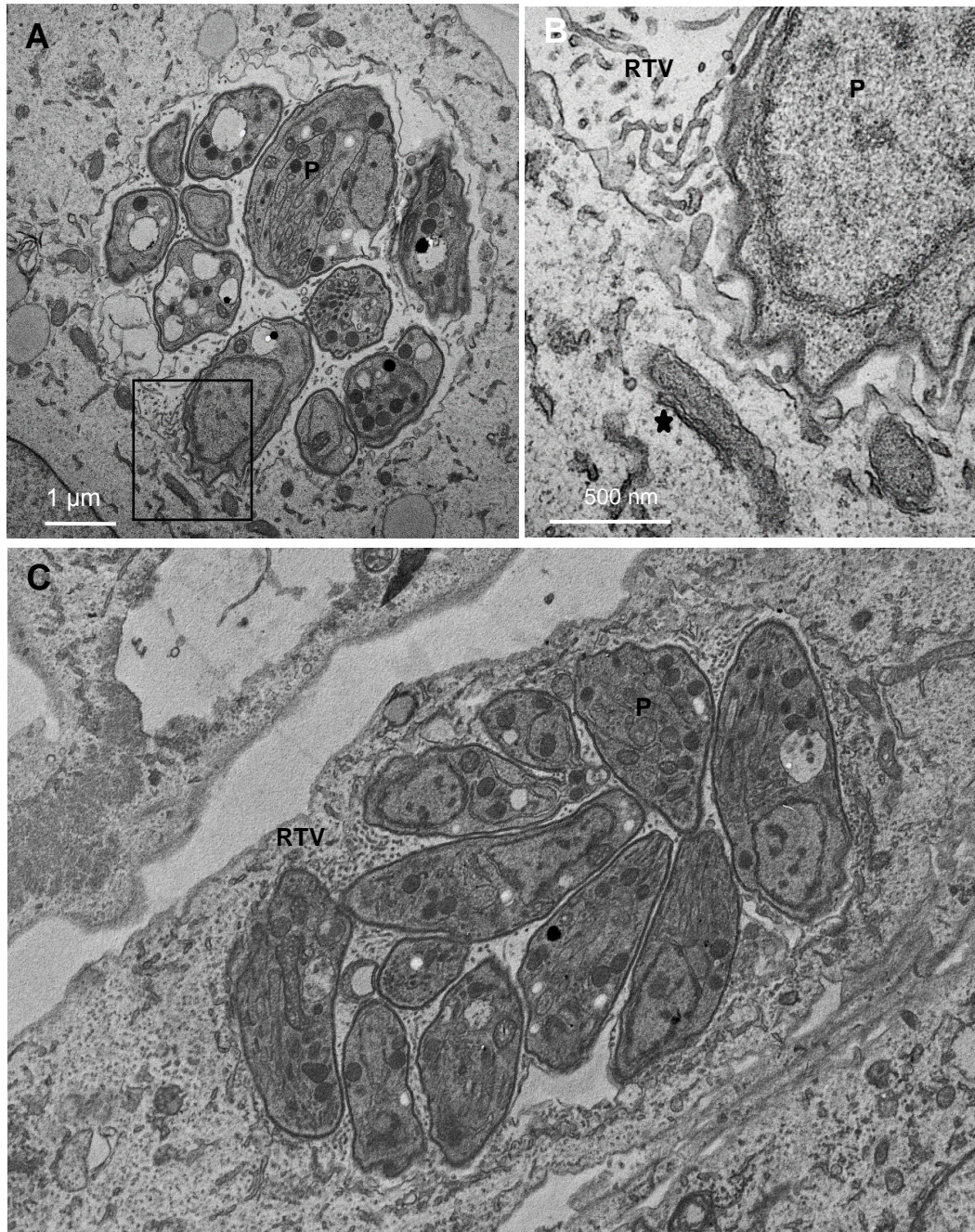


Fig. 5.21 - Aspectos ultraestruturais da interação de *T. gondii* e HUVEC com aumento da RTV e matriz vacuolar. CWP localizado próximo ao VP (A) Aumento da síntese da RTV e da matriz vacuolar e a manutenção da associação de organelas da célula hospedeira à MVP (A-C).

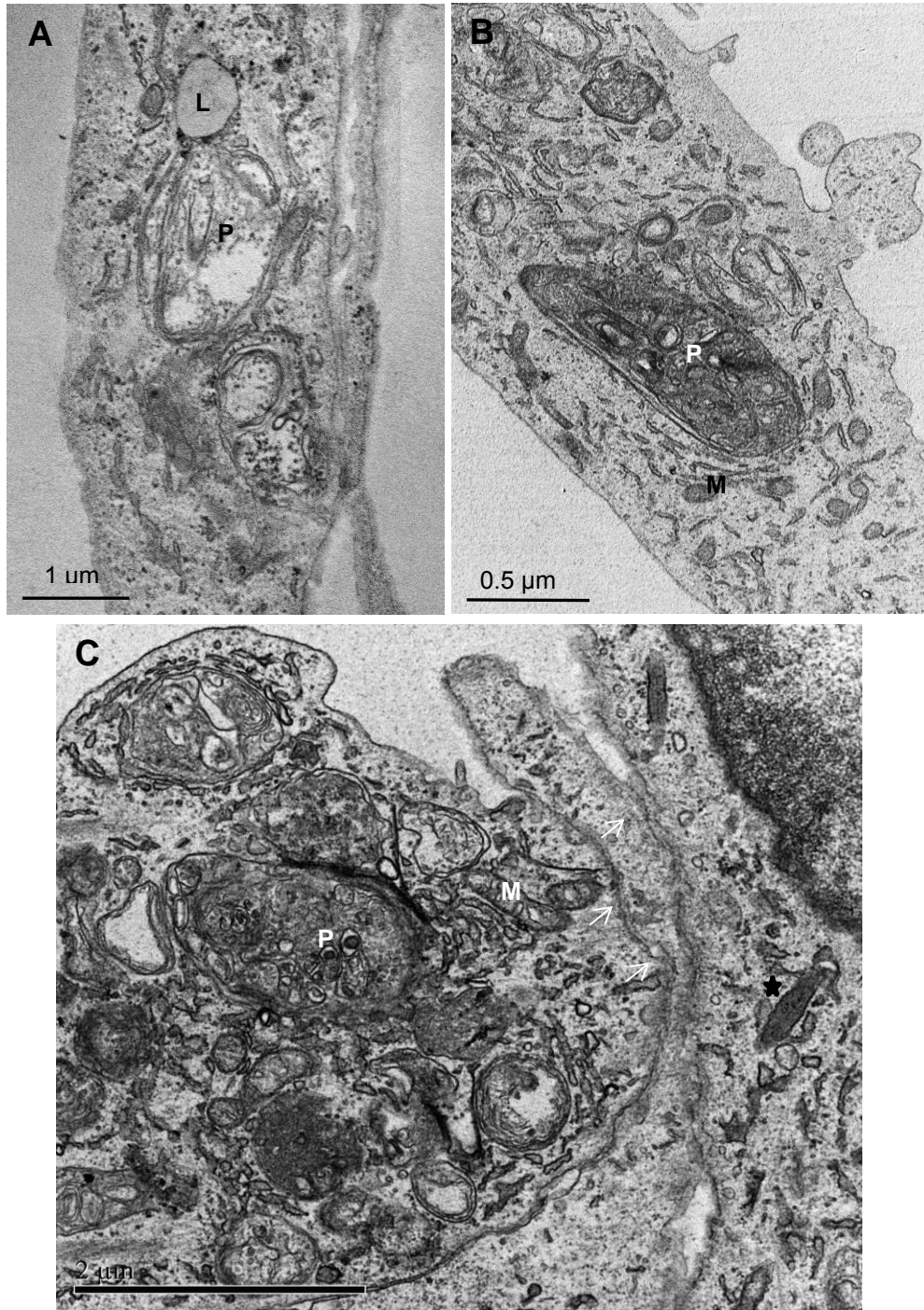


Fig. 5.22 - Aspectos ultraestruturais da interação de *T. gondii* e HUVEC. Parasitos em estado avançado de degradação (A-C). Três células justapostas mantêm as regiões de especialização da membrana (setas).

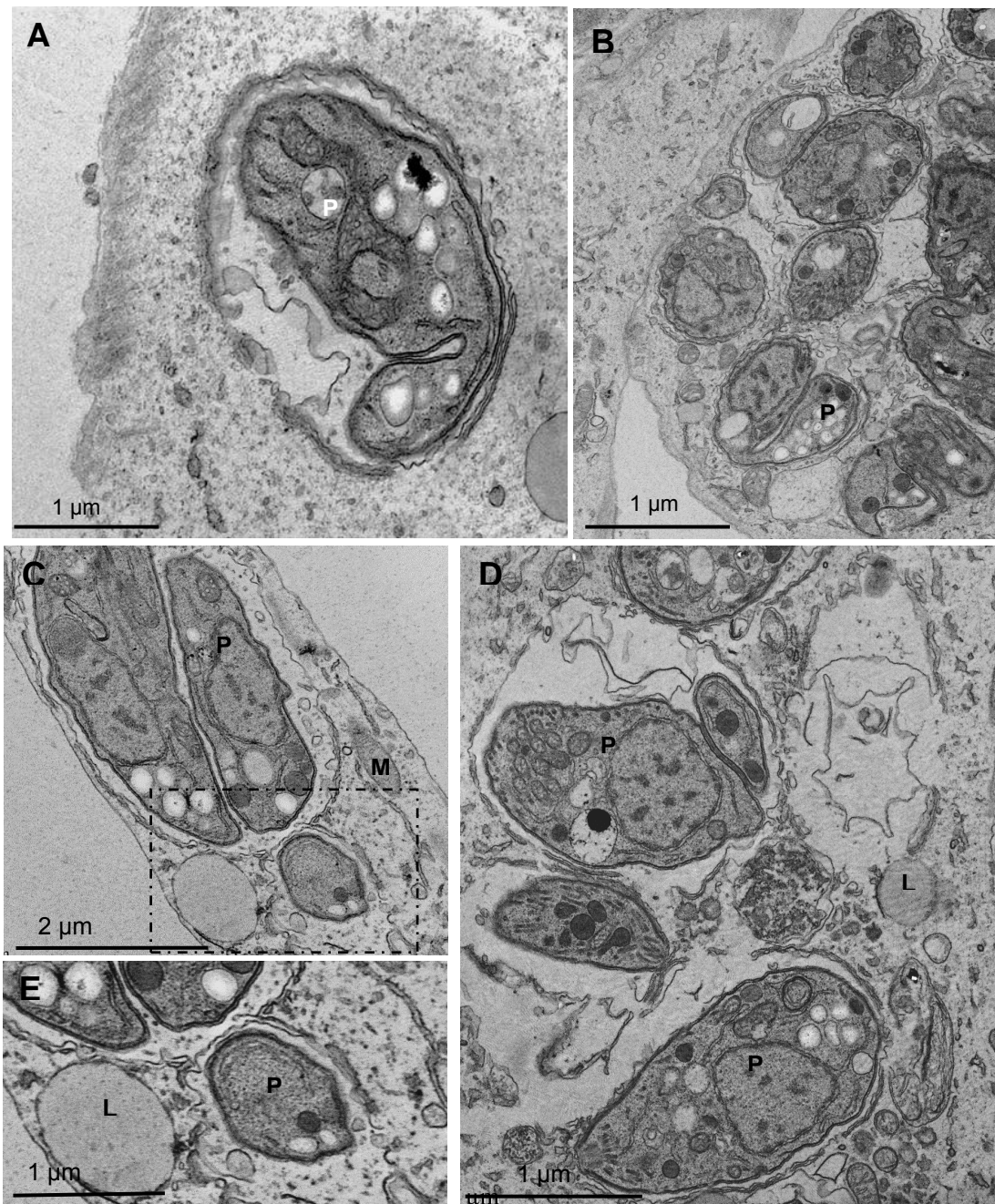


Fig. 5.23 - Aspectos ultraestruturais da conversão de taquizoítos em bradizoítos de *T. gondii* em HUVEC. A associação de CL e demais organelas com vacúolos em diferenciação (A-D).

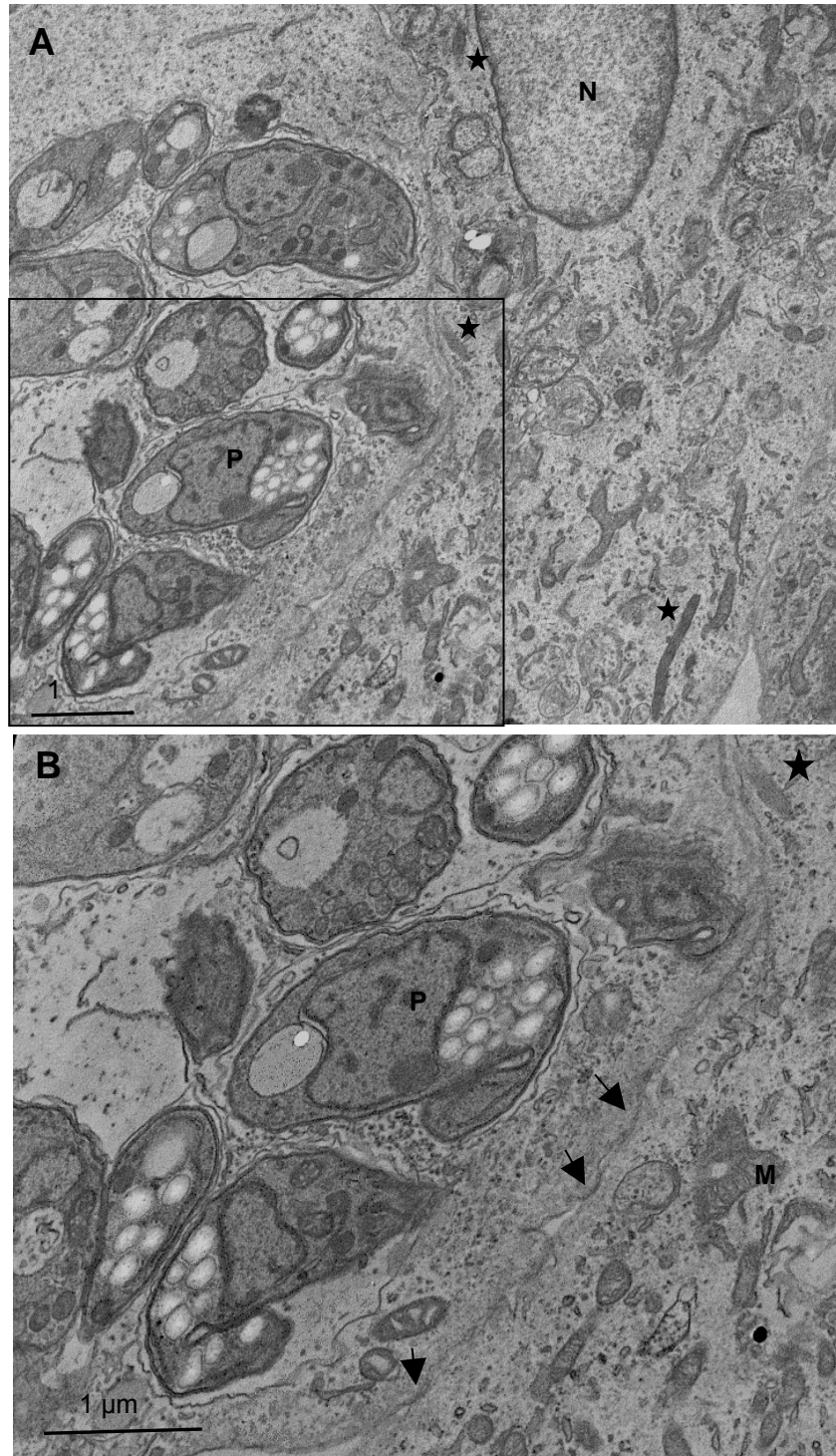


Fig. 5.24 - Grânulos de glicogênio contidos no interior de VP com taquizoítos e bradizoítos e manutenção estrutural das áreas juncionais em HUVEC infectada por *T. gondii*. VP contendo \star bradizoítas CWP () localizados próximos à membrana plasmática (A) junções celulares preservadas na célula infectada (setas) (B).

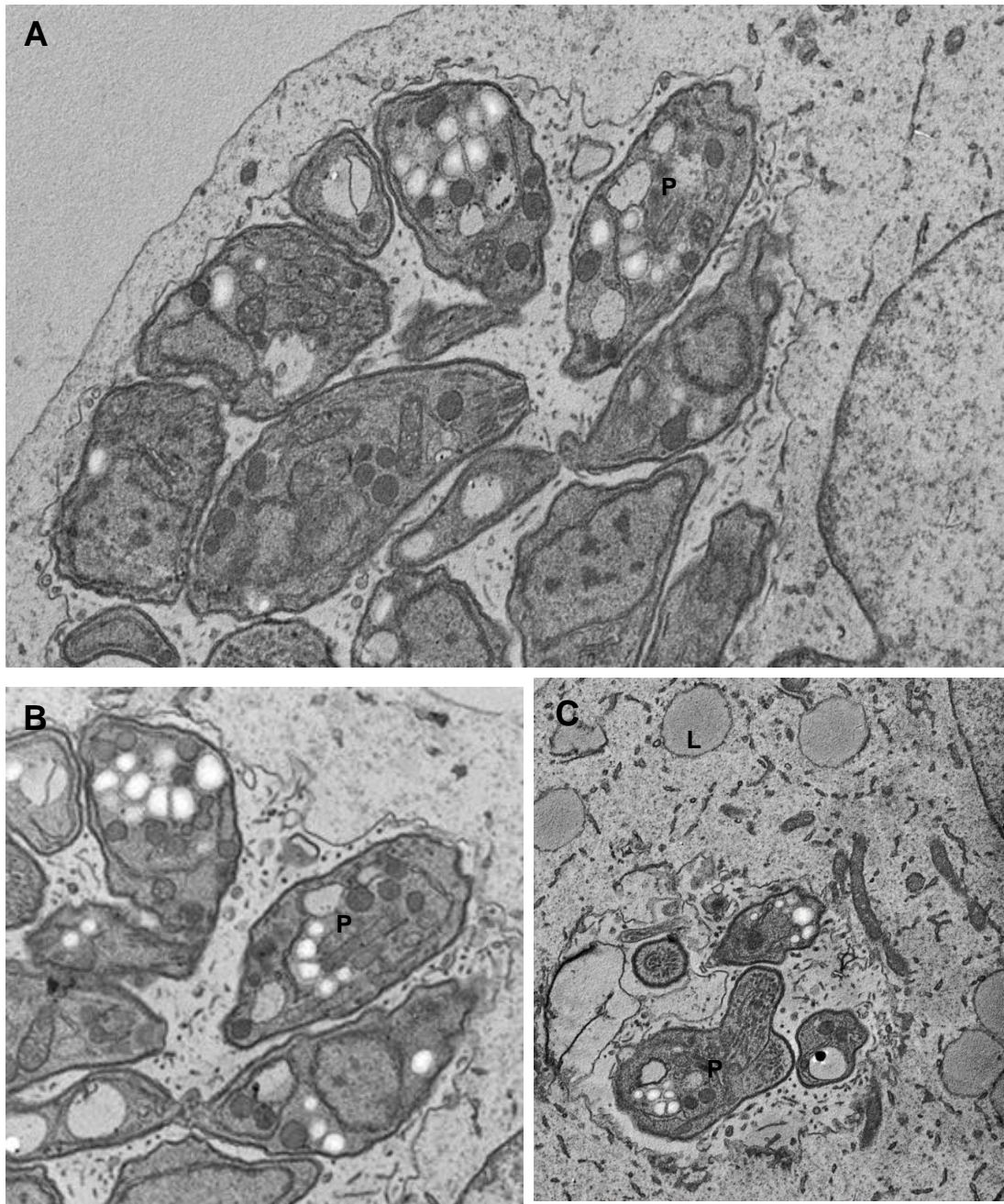


Fig. 5.25 - Associação de organelas ao vacúolo parasitóforo durante o processo de conversão de taquizoítos em bradizoítos em HUVEC. (A-C).

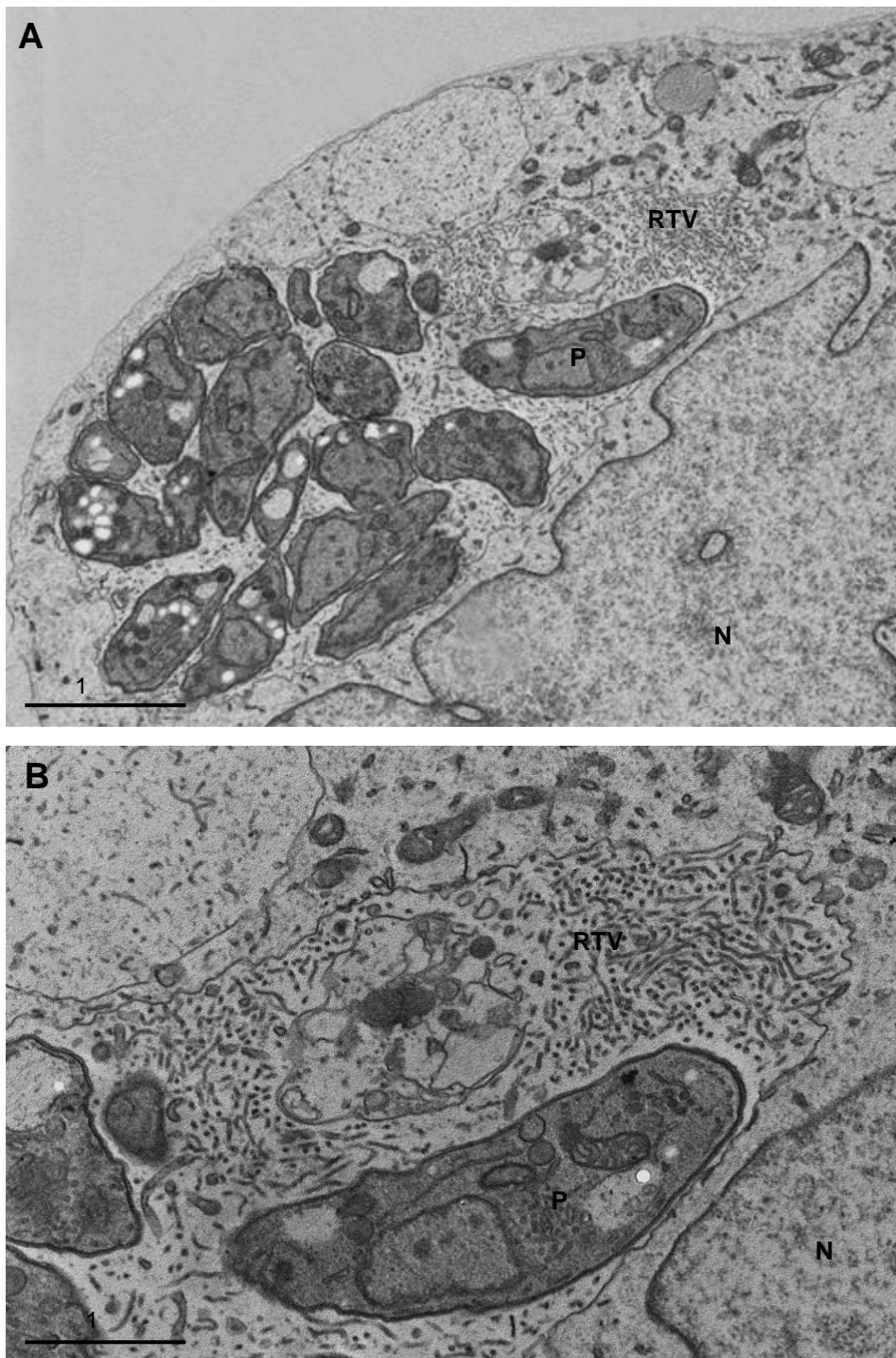


Fig. 5.26 - Processo de conversão de tachizoítos em bradizoítos em HUVEC. Vacúolos apresentando RTV exuberante durante o processo de interconversão de tachizoítos em bradizoítos de *T. gondii* em HUVEC (A e B).



Fig. 5.27 – Bradizoítos de *T. gondii* encontrados no meio extracelular.

5.4. Cistogênese de *T. gondii* em HUVEC

A não evidenciação da parede cística ou a modificação estrutural da membrana do vacúolo parasitóforo que continha bradizoítos de *T. gondii* por MET, indicativo da formação da parede cística, nos levou a busca de outras ferramentas que pudessem esclarecer esse evento. Desta forma, culturas de HUVEC infectadas com a cepa ME-49 e fixadas para fluorescência com 96 horas de interação revelaram que a cistogênese, de fato, se estabeleceu em HUVEC. A incubação das células com a lectina DBA conjugada à Rodamina possibilitou a confirmação de cisto em HUVEC com a marcação da parede cística. A cistogênese nesse modelo celular ocorreu espontaneamente, independente de manobras experimentais químicas ou físicas que pudessem induzir a formação de cistos (Fig. 5.28). Concomitantemente, não foi raro observar a presença de células contendo cistos ao lado de vacúolos repletos de parasitos, muito provavelmente taquizoítos, taquizoítos em transição para bradizoítos ou bradizoítos (Fig. 5.29). Algumas células apresentavam ao lado de cistos, formas taquizoítos em plena proliferação por endodiogenia, com a formação de rosetas (Fig. 5.30).

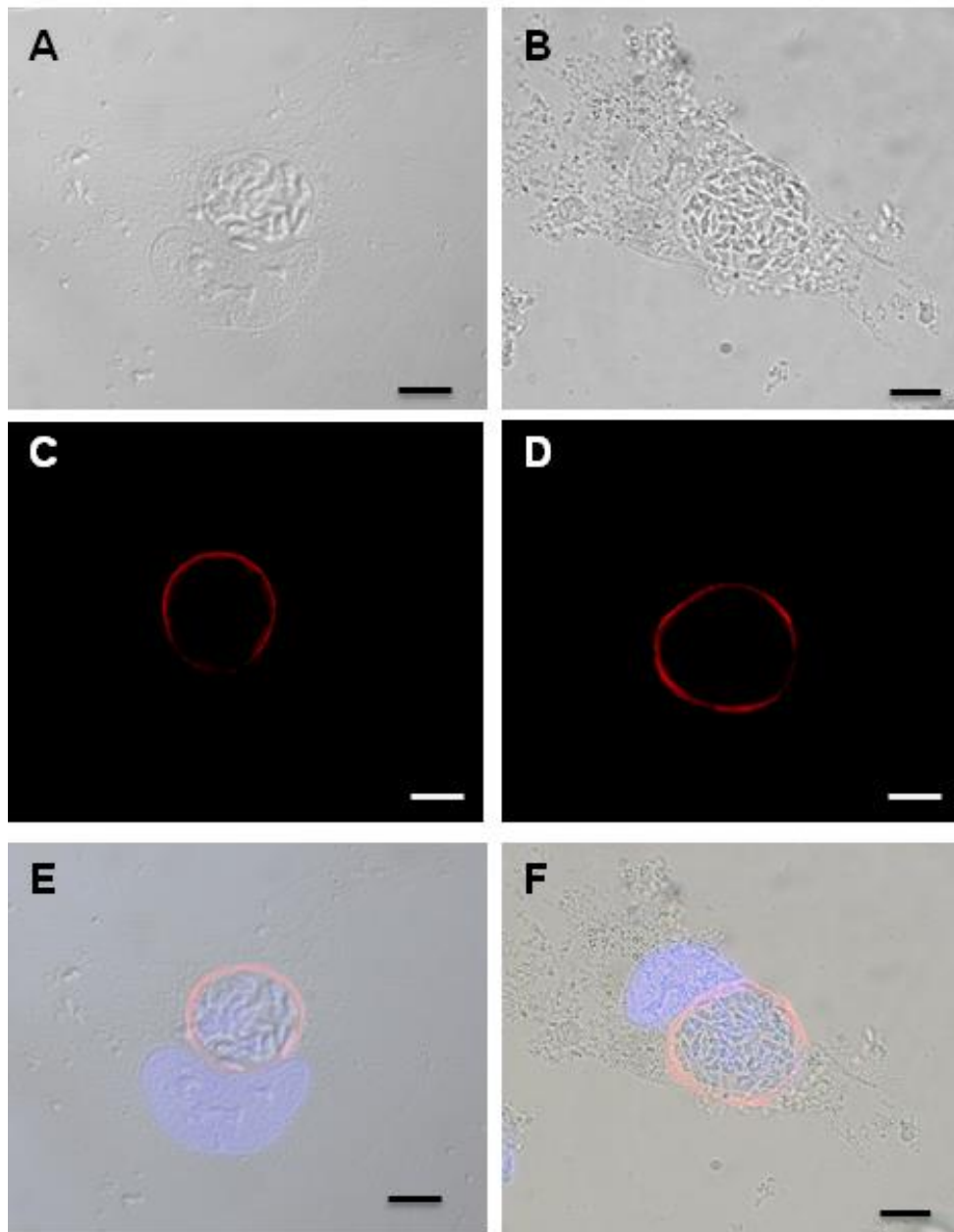


Fig. 5.28 - Cistos de *T. gondii* da cepa ME49 em HUVEC: (A – B) Imagens de cisto por microscopia de contraste diferencial de fase. (C - F) Marcação da parede cística com lectina DBA- RODAMINA e núcleo da célula e o núcleo do parasito marcados por DAPI [Barra = 10 μ m]

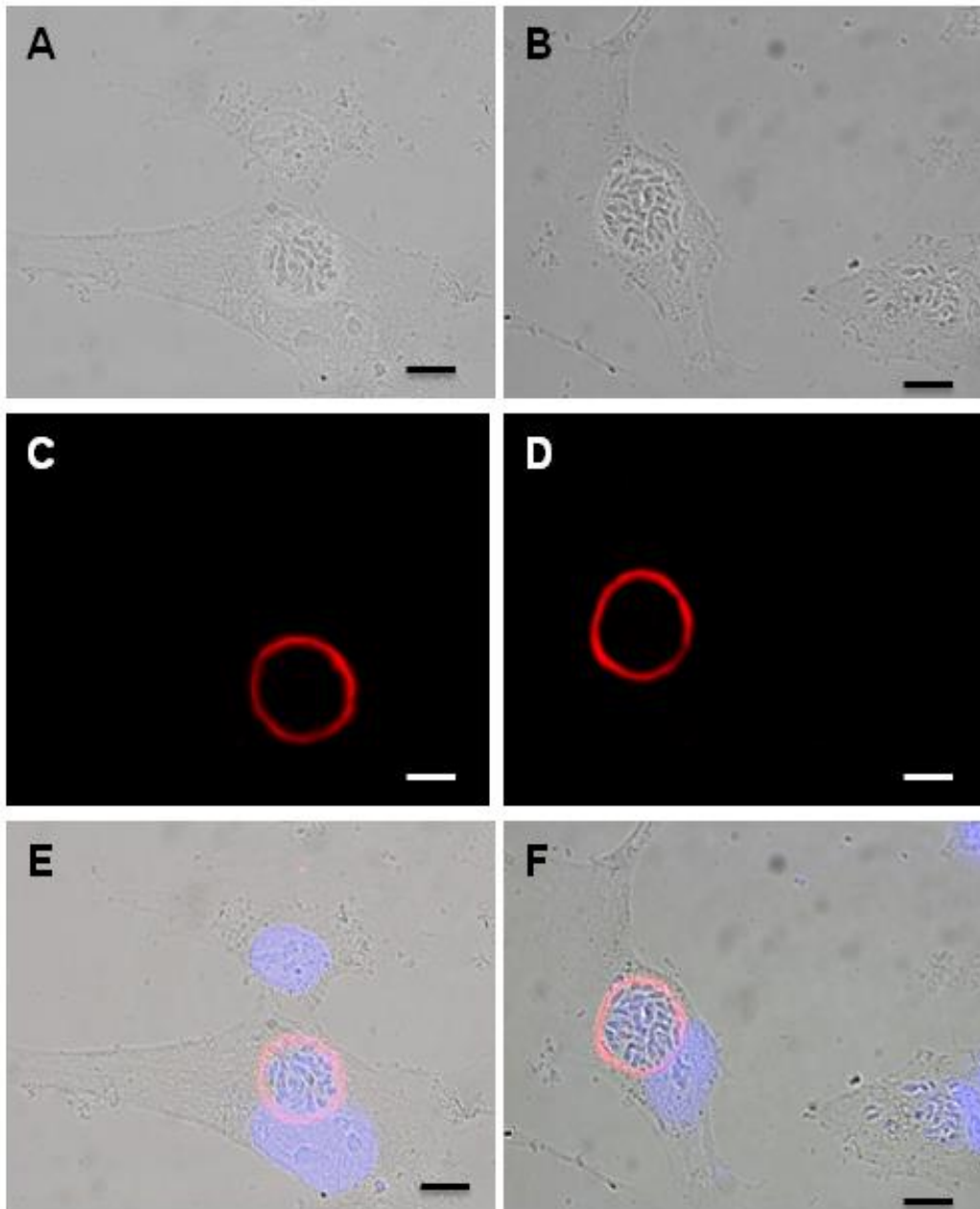


Fig. 5.29 - Cistos de *T. gondii* da cepa ME-49 em HUVEC: (A – B) Imagens de cisto vista por microscopia de contraste diferencial de fase. (C - F) Marcação da parede cística com lectina DBA- RODAMINA e núcleo da célula e o núcleo do parasito marcados por DAPI. [Barra = 10 μ m]

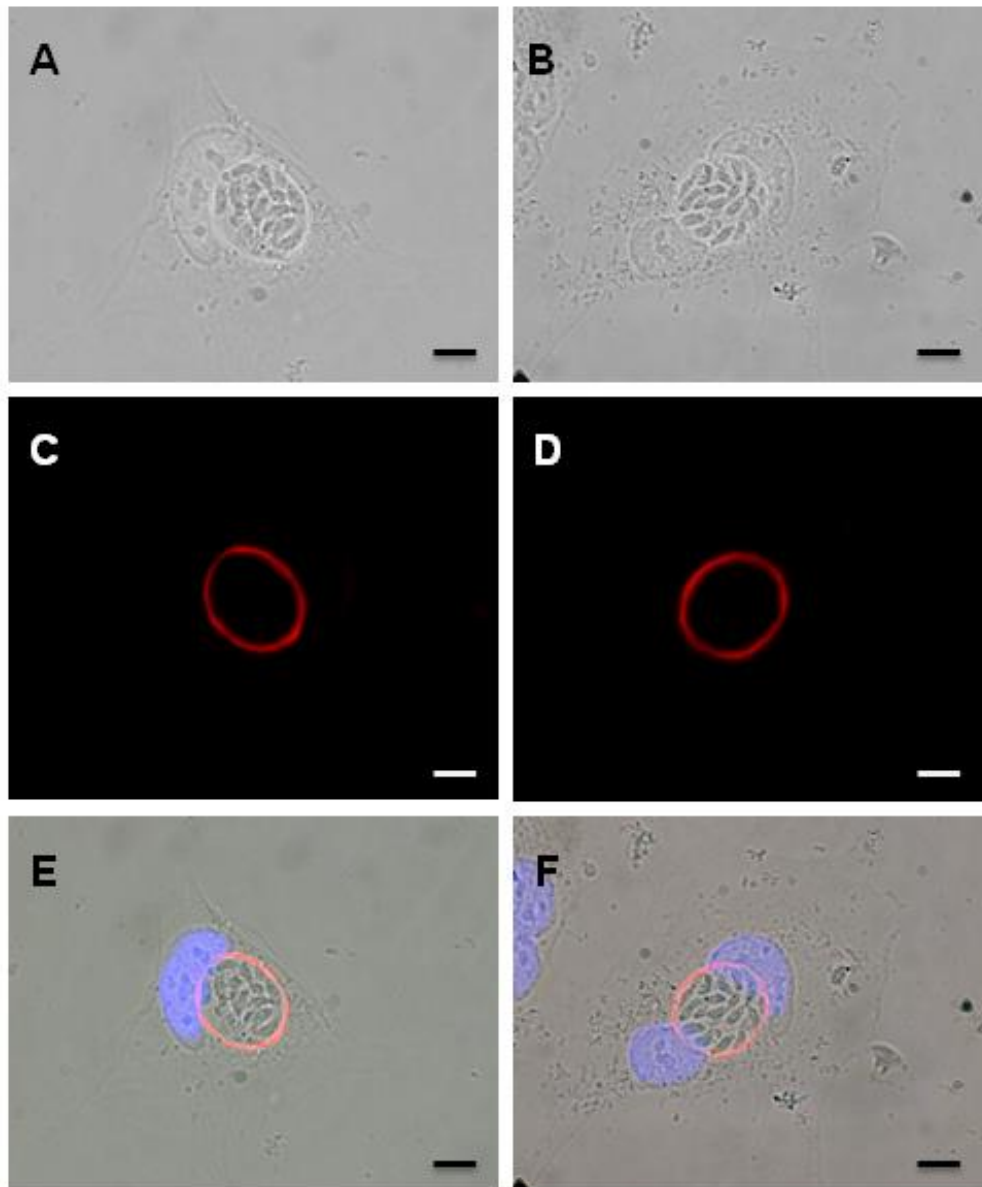


Fig. 5.30 - Cistos de *T. gondii* da cepa ME49 em HUVEC. (A-B) Imagens de cisto vista por microscopia de contraste diferencial de fase. (C - F) Parede cística marcada por DBA- RODAMINA e rosetas (seta) horas após 96h de infecção [Barra = 10 μ m].

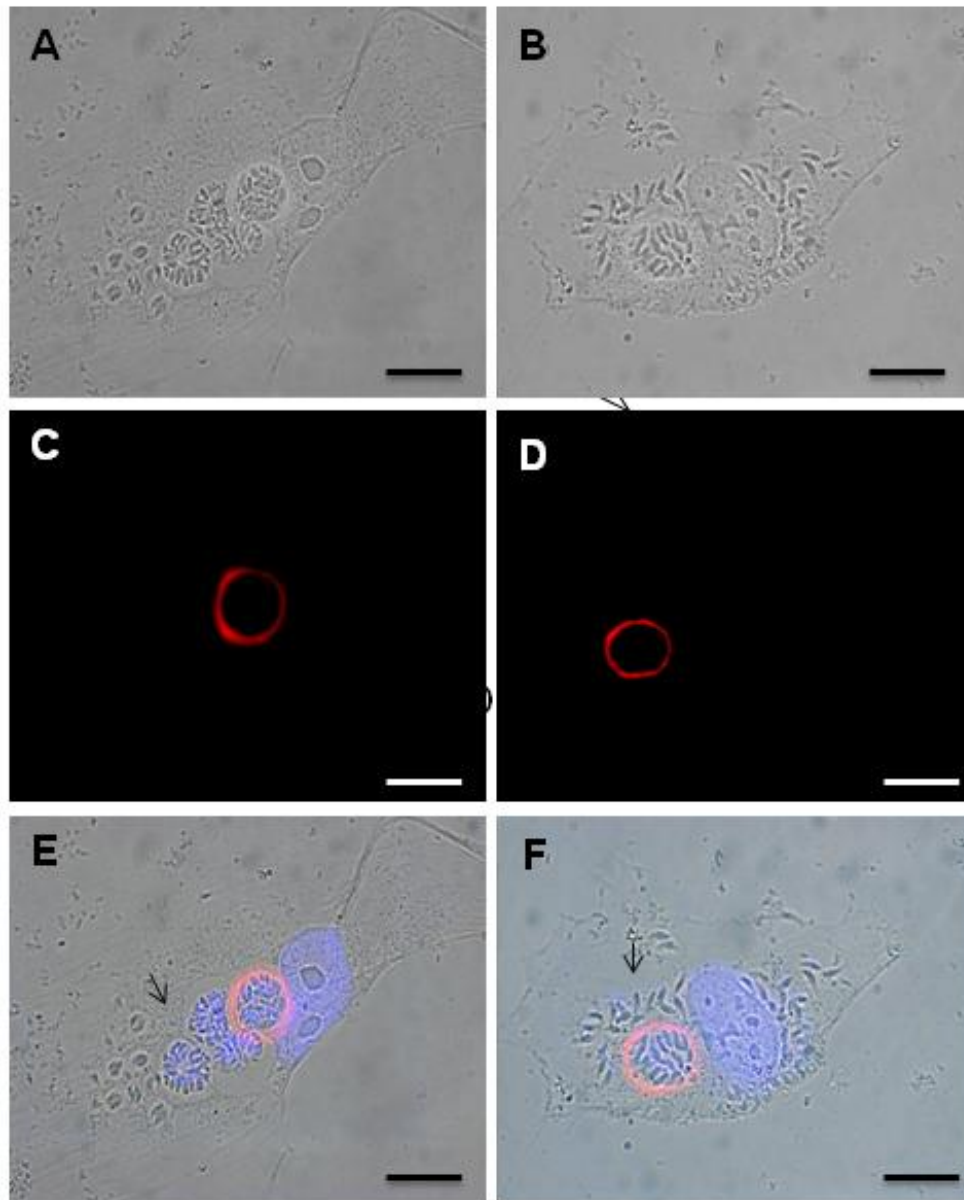


Fig. 5.31 – Cistos de *T. gondii* da cepa ME49 em HUVEC: (A – B) Imagens de cisto vista por microscopia de contraste diferencial de fase. (C - F) Marcação da parede cística com lectina DBA- RODAMINA e núcleo da célula e o núcleo do parasito marcados por DAPI. [Barra = 10μm]

VI. DISCUSSÃO

A presente dissertação empregou culturas primárias de células endoteliais de veia do cordão umbilical como modelo de estudo da toxoplasmose experimental. A principal abordagem foi a análise da infectividade de HUVEC frente a duas cepas genotipicamente diferentes de *T. gondii*: do tipo 1 - altamente virulenta, a RH e do tipo 2, a ME-49 – avirulenta. As questões respondidas foram: a influência da metodologia de obtenção de taquizoítos na capacidade dessas cepas invadirem as HUVEC, sua suscetibilidade a novas infecções e a proliferação desses parasitos nesse microambiente. Detalhes da resposta de HUVEC à infecção pelo *T. gondii* foram monitorados por análise ultraestrutural, nas diferentes etapas do desenvolvimento intracelular do parasito. O interesse nessas abordagens em HUVEC decorreram da hipótese de que durante a gestação, o cordão umbilical poderia ser, não apenas uma via de transporte do parasito para chegar até ao feto, como também, ser um repositório de formas latentes do *T. gondii*. Dessa forma, foi necessário definir se em HUVEC a cistogênese se estabelecia e, nas condições experimentais aplicadas nesse trabalho, essa hipótese foi confirmada.

No contexto da toxoplasmose congênita, cujo dano ao feto pode assumir consequências gravíssimas, incluindo a sua morte, um estudo direcionado para o entendimento da transmissão vertical do parasito tem alta importância. Então, o cordão umbilical humano, um anexo embrionário rico em diversos tipos celulares, foi utilizado como fonte primária de células endoteliais. O estabelecimento de culturas primárias de HUVEC introduzido por MARUYAMA (1963) e aperfeiçoado por JAFFE *et al.* (1973), utilizando a enzima colagenase para seu isolamento, revolucionou o cultivo das HUVEC, sendo o método mais utilizado até os dias atuais, como empregado no presente estudo. Vários grupos têm buscado outros protocolos para otimização de obtenção dessas células (MARIN *et al.*, 2001; BAZZONI *et al.*, 2002; LAURENS e VAN HINSBERGH, 2004; BAUDIN *et al.*, 2007; DAVIS *et al.*, 2007; JIMENEZ *et al.*, 2013). No mais recente trabalho nesta linha é o artigo de Jimenez e colaboradores (2013) que optaram pelo uso exclusivo de tripsina à temperatura ambiente. Nós testamos

esse protocolo alternativo, por sua simplicidade e maior rapidez do método, utilizando sucessivas e curtas etapas de dissociação com a solução de dissociação composta por tripsina 0,05% + EDTA 0,022% comparando com o protocolo desenvolvido por Jaffe et al. (1973) que utilizaram a colagenase a 0,06% numa única etapa a 37°C. O rendimento celular foi aquém do método de Jaffe e colaboradores, não observamos multiplicação dessas células e após 5 dias de cultivo, as células entraram em processo de morte. Optamos, então, pelo método desenvolvido por Jaffe, que além da melhor viabilidade celular, não teve limitação no tamanho do cordão umbilical, com rendimento em média de 900 mil células. Assim, esta alternativa possibilitou, inclusive, o desenvolvimento de um protocolo para congelamento dessas células nas passagens iniciais (1 e 2), garantindo sua preservação e a constituição de um banco de células que atendeu a demanda para o desenvolvimento desse projeto.

Nas nossas condições de cultivo de HUVEC, as células foram facilmente propagadas e capazes de se diferenciar, como demonstrado por microscopia de contraste de fase, imunocitoquímica e microscopia eletrônica de transmissão. As células crescidas sobre um revestimento de gelatina a 2%, após 7 - 10 dias de cultivo, permitiram a adesão, migração, proliferação e diferenciação das células, formando uma monocamada confluenta (GRANT *et al.*, 1990). Além disso, apresentavam morfologia semelhante à paralelepípedos e núcleo esférico com grânulos perinucleares (corpúsculos de Weibel-Palade - identificados por imunocitoquímica), reproduzindo a morfologia típica do tecido endotelial *in vivo* (MACIAG *et al.*, 1981; SMEETS *et al.*, 1992; MARIN *et al.*, 2001).

A análise ultraestrutural das HUVEC indicou que as células endoteliais mantidas em meio suplementado com fatores de crescimento preservaram sua morfologia e funcionalidade. O citoplasma apresentou as características típicas dessas células *in vivo* (JAFJE *et al.*, 1973; ELGJO *et al.*, 1975; JIMÉNEZ *et al.*, 2013), com numerosas vesículas, Golgi proeminente, grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso curtos e distribuídos pelo citoplasma, muitas mitocôndrias, glicogênio e corpúsculos lipídicos.

Os complexos juncionais das células endoteliais exercem grande importância na funcionalidade do tecido, como a regulação da permeabilidade da barreira e diapedese de leucócitos (BAZZONI *et al.*, 2004). A função dessas junções sofre regulação por meio de estímulos extracelulares que ativam vias de sinalização

intracelulares. Estas, por sua vez, induzem uma reorganização dos filamentos de actina do citoesqueleto que permitem a adesão focal culminando com a formação de fibras de estresse (MILLAN *et al.*, 2010). Assim, associada aos aspectos morfológicos, as imagens geradas por MET revelaram os três tipos de junções encontradas no endotélio, as junções de aderência, de oclusão e as “gap”, bem como a formação das fibras de estresse, indicativos de que as HUVEC preservaram sua funcionalidade como barreira endotelial.

Corpúsculos de Weibel-Palade, organelas específicas de células endoteliais, têm sido obtidos com grande preservação estrutural e maior resolução empregando-se a metodologia de congelamento por alta pressão para a análise por MET, técnica que fixa o material biológico como no seu estado *in vivo* (VALENTIJN *et al.*, 2007; ZENNER *et al.*, 2007). No presente estudo, as análises ultraestruturais de HUVEC mostraram a manutenção do metabolismo celular, obtendo-se imagens da biogênese de corpúsculo de Weibel-Palade, na rede trans do Golgi com excelente qualidade. Por meio de citoquímica ultraestrutural, adicionando-se o ferricianeto de potássio ao ósmio, durante a pós-fixação para MET, obteve-se maior detalhe estrutural com aumento de eletrondensidade e preservação de membranas. Então, por meio dessa técnica menos sofisticada foi possível monitorar o processo de maturação dos CWP com uma série de imagens representativas, visualizando-os ainda imaturos, localizados próximos ao núcleo da célula. Estruturas em formato de bastão exibindo estriações longitudinais, características dessas organelas, como bem descritas por VALENTIJN *et al.* (2007) e ZENNER *et al.* (2007), foram observadas no presente trabalho. Essas estriações nos CWP conferidas pelos túbulos do fator de von Willebrand, bem como a baixa eletrondensidade típica da fase inicial do processo de sua maturação, foram aqui demonstradas.

Além disso, a visualização de imagens de fusão homotípica, que é considerada como uma etapa da maturação dos CWP foi bem caracterizada. Nossas imagens são semelhantes às encontradas na literatura (ZENNER *et al.*, 2007) e, além de observarmos os corpúsculos já fusionados, também detectamos dois corpúsculos em organização justapostos, que é apontada como etapa que antecede a fusão.

Em um estudo recente (GORDON e PRIMO, 2016) foi caracterizado, pela primeira vez, a endocitose compensatória de CWP em células endoteliais, usando novas técnicas ultraestruturais e bioquímicas. A endocitose compensatória é uma forma de restringir a expansão da membrana em células com intensa atividade endocítica e, dessa forma, preservar o tamanho da célula e a tensão da membrana. Além disso, tem a função de retornar as proteínas-chaves presentes na membrana integral, de volta para a célula (REIDER e WENDLAND *et al.*, 2011; GORDON e PRIMO, 2016). Embora esse evento ainda seja mal compreendido em células endoteliais, trata-se de um processo importante para a exocitose do fator de von Willebrand. Os autores demonstraram que a maioria dos eventos exocíticos do corpúsculo de Weibel-Palade, não ocorre por fusão total da organela à membrana plasmática. Assim, após a exocitose do conteúdo, os CWP vazios persistem como estruturas vesiculares revestidas por clatrina (STEVENSON *et al.*, 2017). Nós fomos capazes de flagrar esse processo ocorrendo em HUVEC *in vitro*. As imagens mostram as vesículas achatadas revestidas por clatrina próximas à membrana da célula, com uma fenda sem nenhum conteúdo em seu interior. Dessa forma, as imagens obtidas sugerem fortemente que estamos diante de um processo de endocitose compensatória, ainda pouco explorada e característica de células endoteliais.

Outro dado ultraestrutural de células endoteliais foi detectado: grande número de cavéolas em HUVEC, que são invaginações na membrana plasmática. Acredita-se que sua função esteja relacionada à transdução de sinal e regulação do tráfico vesicular endotelial (JAFFE *et al.*, 1973a; ELGIO *et al.*, 1975; JIMÉNEZ *et al.*, 2013). Ensaios abordando vias endocíticas sugerem que as cavéolas e a presença de receptores no seu interior contribuam para a permeabilidade seletiva das células endoteliais (FENG *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 2002; FRANK *et al.*, 2003). Além disso, a proteína caveolin-1 é capaz de inibir a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), o que também pode colaborar para a regulação da barreira endotelial (FUKURUMA *et al.*, 2000; FRANK *et al.*, 2003). Um estudo visando explorar a participação dessas estruturas no processo de invasão do *T. gondii* em células endoteliais merece uma atenção especial.

Um importante achado nos nossos ensaios foram os numerosos corpúsculos lipídicos observadas nas culturas de HUVEC. As informações sobre corpúsculos lipídicos em células endoteliais são escassas na literatura. No entanto, acredita-se que eles atuem como um importante repositório intracelular de ácidos graxos e ácidos araquidônicos, além de atuar na formação de eicosanoides (BOZZA *et al.*, 1996; 1998). Estudos sugerem que a produção de corpúsculos lipídios seja modulada por fatores referentes ao microambiente celular. Scarfo e colaboradores, em um estudo de indução de hipóxia em dois subtipos de células endoteliais, relataram que a formação dessas estruturas pode variar de acordo com a origem da célula, o que indica a singularidade na resposta de cada célula (SCARFO *et al.*, 2001). Em nossos ensaios foi possível observar a heterogeneidade da presença dos corpúsculos lipídicos em uma mesma cultura e até numa única célula. Esse conjunto de dados reforça a aplicabilidade dessas culturas na proposta desse trabalho, de explorar a interação de *T. gondii* e células endoteliais, mimetizando o tecido *in vivo*.

Apesar da grande importância de HUVEC no contexto da transmissão congênita, os estudos com relação à interação de *T. gondii* e células endoteliais são escassos. A maioria dos trabalhos aborda a interação com a cepa RH e por tempos curtos, avaliando o papel da infecção no metabolismo celular ou eventos relacionados à formação do vacúolo e aspectos imunológicos (DIMIER e BOUT, 1993, 1996; BENEDETTO *et al.*, 1997; CORTEZ *et al.*, 2005). Estudos apontam que as cepas virulentas, como a RH, possuem maior capacidade de disseminação através das barreiras biológicas (SAEJI *et al.*, 2005; ORTIZ-ALEGRÍA *et al.*, 2010). No entanto, levantamentos epidemiológicos em algumas partes do mundo, indicam que as cepas consideradas avirulentas, como a ME-49, são mais comumente encontradas entre os animais domésticos e em humanos, quer seja adquirida na vida adulta ou durante a infecção congênita (revisado em ORTIZ-ALEGRÍA *et al.*, 2010).

Pouco se sabe sobre a invasão, multiplicação e destino intracelular do parasito em HUVEC. Solares e Canedo (2013) desenvolveram um estudo sobre a capacidade infectiva de duas cepas de *T. gondii* (ME-49 e RH), frente a dois tipos de célula endotelial, HMEC-1 e HUVEC. Esse estudo abordou apenas as primeiras 4 horas de infecção e demonstrou uma menor capacidade infectiva da

cepa RH quando comparada à cepa ME-49. Esse dado difere dos aqui descritos, mas a utilização de outras metodologias, quanto à carga parasitária, por exemplo, mostra a inviabilização de comparação desses ensaios. Essa dificuldade tem sido apontada por outros autores empregando astrócitos, indicando claramente que a não padronização dos experimentos de interação gera resultados conflitantes e de difícil análise comparativa (CONTRERAS-OCHOA *et al.*, 2012).

Desta forma, o presente estudo analisou a infectividade de taquizoítos das cepas polares (ME-49 e RH) frente às culturas de HUVEC, tendo como diferencial a avaliação, além da capacidade de invasão e multiplicação do parasito, investigar o seu destino intracelular. Com esses objetivos, os períodos de interação se estenderam até 72 h para as análises cinéticas e até 144 h para o desenvolvimento intracelular do parasito. Adicionalmente, um outro parâmetro investigado foi verificar a susceptibilidade da célula hospedeira à infecção em função do método de obtenção dos parasitos e diferentes cargas parasitárias. Esses ensaios foram motivados por algumas observações isoladas no laboratório de que haveria diferença de infectividade entre os procedimentos para obtenção de taquizoítos de cultura de células, durante os experimentos de interação de *T. gondii* com outros modelos celulares, sem um estudo mais sistematizado.

Como mencionado nos resultados, utilizar a mesma carga parasitária para as duas cepas inviabilizou o estudo de tempos mais longos, uma vez que as culturas infectadas pela cepa RH apresentaram intensa lise celular, o que não observamos nas culturas com ME-49. Esse fato já indica a maior capacidade de invasão da cepa RH quando comparado à ME-49. Uma vez ajustando as cargas, observamos que ao infectar as culturas de HUVEC com taquizoítos provenientes do sobrenadante das culturas VERO, com 24 horas de interação, a porcentagem de células infectadas pela cepa RH era muito maior do que as células infectadas com taquizoítos da cepa ME-49. Os resultados gerados dos ensaios de variação da forma de obtenção de Taquizoítos são contrários aos observados com a cepa ME49. Nesse caso, os parasitos obtidos por lise demonstraram ser menos infectivos do que os parasitos recolhidos do sobrenadante. Os parasitos do sobrenadante foram até 71- 81% mais infectivos do que os obtidos por meio da lise, com as relações 1:5 e 1:10.

Para nossa surpresa o comportamento da cepa RH foi justamente o oposto da cepa ME-49: taquizoítos provenientes do sobrenadante das culturas VERO apresentaram uma porcentagem de células infectadas maior (cerca de 60 e 70% nas relações parasito-célula de 5:1 e 10:1, respectivamente) quando comparados com taquizoítos do lisado.

Algumas variáveis interferem na infectividade de *T. gondii* frente à célula hospedeira, tais como: estado de ativação da célula, fase do ciclo celular na qual a célula hospedeira está e a cepa do parasito (ANGELONI *et al.*, 2009; LAVAVINE e ARRIZABALAGA, 2009; YOUN *et al.*, 1991). Os mecanismos moleculares utilizados pelos taquizoítos das cepas apolares RH e ME-49 para invasão da célula podem diferir. Estudos mostram que os parasitos da cepa ME-49 invadem células preferencialmente na fase S do ciclo celular, assim como é capaz de modular o ciclo celular das células adjacentes. Avaliar o tempo necessário para a modulação das células não infectadas ainda é um desafio (YOUN *et al.*, 1991; ANGELONI *et al.*, 2009; LAVINE e ARRIZABALAGA, 2009).

Diante desses resultados, temos algumas hipóteses que podem justificar as diferenças de infectividade observadas entre as duas cepas. A falta de sincronismo de invasão dos parasitos, mesmo num sistema fechado, como o de culturas de células, pressupõe que o egresso desses parasitos seja também assincrônico, e isso possa influenciar na capacidade deles em invadir novas células. A exposição dos parasitos ao meio extracelular poderia levar um percentual desses parasitos à inviabilidade (mortos, pois são parasitos intracelulares obrigatórios) ou menos ativos à invasão, sabendo-se que o *T. gondii* não prolifera em meio de cultura acelular.

Quanto à morte celular, essa variável é controlada pelo teste de azul de tripano durante a quantificação dos parasitos antes da exposição às células, mas a influência na capacidade infectiva desses parasitos é de difícil controle. Uma das maneiras de manter esse sistema mais controlado seria utilizar manobras experimentais para que o processo de adesão, invasão e egresso pudessem ser sincronizados. Essa hipótese tem sido respaldada nos trabalhos de ENDO *et al.* (1982), KASFACS *et al.* (2004), CARRUTHERS *et al.* (2004) e FRUTHER *et al.* (2007). Eles testaram o íon K⁺ como um método de sincronismo para a invasão e

evasão dos parasitos. Eles demonstraram que quando a concentração de potássio no meio extracelular é igual à do interior da célula hospedeira, a permeabilização do VP é interrompida (FRUTH *et al.*, 2007). Além disso, os ensaios de incubação de parasitos com potássio em concentração semelhante à que ele encontra no meio intracelular resulta na perda de motilidade do parasito e inibição da invasão da célula (ENDO *et al.*, 1987). Este efeito paralisante é reversível assim que os níveis de potássio extracelular se normalizam, quando os parasitos se recuperam e invadem as células hospedeiras (KAFSACK *et al.*, 2004). A sensibilidade do parasito às variações das concentrações de íons do ambiente permite, por exemplo, o escape após a permeabilização da MVP provocada por algum dano à célula hospedeira ou durante um processo de morte celular. Dessa forma, como o ambiente externo é baixo em íons de potássio, o parasito possui todas as condições de motilidade necessárias, sendo então, capaz de invadir novas células garantindo a sua sobrevivência. (FRUTH *et al.*, 2007). Desde que os fatores que dão início à motilidade do parasito são ainda pouco conhecidos, alguns aspectos merecem a atenção: ensaios de motilidade e egresso do parasito indicam que a permeabilização da membrana plasmática pelos parasitos, antecede sua evasão da célula hospedeira. A acidificação do vacúolo parasitóforo é induzida pela secreção de proteínas dos micronemas, as perforinas secretadas pelo parasito formam poros na membrana celular que causam a diminuição de potássio e aumento de cálcio intracelular, desencadeando, assim, a saída dos parasitos (BLACK *et al.*, 2000; MOUDY *et al.*, 2001; ROIKO *et al.*, 2009; 2013; 2014).

Outras estratégias têm sido também utilizadas, como o composto nigericina, cujo mecanismo de ação é aumentar o influxo de potássio na célula, induzindo a saída dos parasitos da célula, reproduzindo o que ocorre quando a membrana é permeabilizada. No entanto, os ensaios de sincronização demonstraram que o composto não tem efeito em parasitos não móveis, uma vez que ao empregar Citocalasina D, um inibidor de motilidade, os parasitos continuaram retidos no interior da célula (FRUTH *et al.* 2007). Uma alternativa para a sincronização é por meio de manobra física, mantendo, transitoriamente, as culturas infectadas por 20 minutos a 4°C, seguida da elevação da temperatura para 37°C por 2 min (GARCIA-RÉGUET *et al.*, 2000). Frente a essas opções, nosso grupo deverá

introduzir essas manobras para esclarecer os fatores que possam contribuir para as diferenças apontadas nos nossos ensaios decorrentes dos métodos de obtenção dos taquizoítos mantidos em cultura de células.

Os resultados mostraram que taquizoítos da cepa ME-49 recolhidos do sobrenadante de células Vero que tinham concluído o ciclo lítico, com liberação dos parasitos no meio externo, apresentaram capacidade infectiva muito inferior, quando comparados aos parasitos provenientes da lise mecânica, que foram cerca de 80% mais infectivos, independente da carga parasitária. Além disso, nos ensaios utilizando parasitos obtidos pela lise mecânica, observamos mais vacúolos por célula infectada já nas primeiras 24 horas, e esse padrão se manteve ao longo do tempo. No entanto, o método de obtenção dos taquizoítos de ME-49, a princípio, não pareceu interferir na capacidade multiplicativa desses parasitos.

Esse estudo mostra claramente que o método de obtenção dos parasitos também é uma variável determinante quanto à capacidade infectiva de *T. gondii* frente à HUVEC. Nós não podemos, ainda, elucidar o mecanismo pelo qual taquizoítos obtidos por lise da cepa ME-49 possam ter maior capacidade infectiva daqueles recolhidos do sobrenadante. A cepa RH tem comportamento oposto, e esse dado reforça a ideia de que os parasitos dessas duas cepas tenham interações moleculares diferentes com a célula hospedeira. Sendo assim, esses resultados demonstram que a forma de obtenção dos parasitos é mais uma variável a ser considerada nos estudos de comparação de infectividade entre cepas de *T.gondii*.

As análises ultraestruturais de HUVEC infectadas com taquizoítos da cepa ME-49 de *T. gondii* por períodos de 24 a 144 h permitiu monitorar a dinâmica da resposta celular frente à infecção para o estabelecimento do ciclo lítico e da conversão taquizoíto-bradizoíto.

Alguns dos eventos celulares observados durante a interação de *T. gondii* e HUVEC, descritos no presente trabalho, apresentaram similaridades com diferentes modelos celulares *in vitro*, com as quais o parasito interage ou não no sistema *in vivo*. As justificativas para mais essa investigação se baseiam em alguns parâmetros: um estudo morfológico ultraestrutural detalhado da interação de *T. gondii* e HUVEC, célula que está envolvida na transmissão vertical do

parasito é inédito; a biologia da célula endotelial da veia do cordão umbilical apresenta um amplo espectro de funções, dentre elas, alta atividade secretora e metabólica, exercendo um papel importante no controle de proteínas e hormônios (CINES *et al.*, 1998; GALLEY e WEBSTER, 2004). A presença de uma organela específica, os CWP, faz desta célula um nicho especial, onde o parasito se alberga. Explorar essas particularidades celulares é uma estratégia que pode fornecer dados biológicos que contribuam para um melhor entendimento da toxoplasmose congênita, considerando-se seu envolvimento nessa importante via de transmissão vertical do *T. gondii*.

Os detalhes morfológicos da interação de HUVEC com *T. gondii* mostrou: ativo recrutamento de suas organelas para o entorno do vacúolo parasitóforo nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasito; VP contendo parasitos em duplas, indicativo de divisão celular; vários parasitos por VP num processo de endodiogenia clássico; VP com parasitos em processo de conversão de taquizoíta para bradizoítos; VP contendo bradizoítos típicos; células com mais de um vacúolo, às vezes muitos vacúolos com um único parasito; presença simultânea de VP com taquizoítos e bradizoítos e, outros com bradizoítos na mesma célula.

Acumulamos fortes evidências de que ocorre assincronismo da infecção e do desenvolvimento intracelular do parasito. Diferentes estágios de diferenciação do parasito na mesma célula sugerem que existam mecanismos autônomos do microambiente vacuolar, desencadeando vias diferentes do ciclo biológico do parasito: do ciclo lítico e da cistogênese. Essas variações no desenvolvimento intracelular do parasito demonstram claramente a falta de refratariedade da HUVEC a novas infecções (infecções múltiplas atemporais), e a falta de sincronismo de infecção, como exhaustivamente discutido anteriormente. Esses eventos já têm sido reportados com outros tipos celulares, como a célula muscular esquelética, astrócitos e células epiteliais de diferentes origens (GUIMARÃES *et al.*, 2008, 2009; PAREDES-SANTOS *et al.*, 2013; DE MUNO, 2015; GARCIA, 2016; MARQUES, 2017).

Após 48 horas de infecção, observamos variação do número de vacúolos e de parasitos por vacúolo, reforçando os resultados descritos por microscopia de luz.

Nesse período, imagens mostram a ativa multiplicação por endodiogenia inconcluída, com presença ainda do corpo residual. Ao longo do desenvolvimento intracelular no período analisado até 144 h é notória a associação de organelas de HUVEC com o VP. Mitocôndrias perdem sua organização original dispersa pelo citoplasma e se deslocam, circundando o VP nos diferentes estágios de diferenciação do parasito.

Tem sido sugerido que o *T. gondii*, por meio da secreção de proteínas das róprias, promova ainda o recrutamento de outras estruturas da célula, tais como, retículo endoplasmático e corpúsculos lipídicos (SINAI *et al.*, 1997, 2001; GOMES *et al.*, 2014; MOTA *et al.*, 2014; MARQUES, 2017). A hipótese mais aceita é que este recrutamento iria se favorecer da maquinaria energética da célula hospedeira, garantindo o seu desenvolvimento intracelular e manutenção durante a fase crônica da infecção (SINAI e JOINER, 1997; LALIBERTÉ e CARRUTHERS, 2008; PENG *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2014; de OLIVEIRA, 2014). Outra hipótese também aceita é que a associação do RER esteja relacionada com o aumento da membrana do vacúolo parasitóforo durante a replicação do parasito (DE MELO e DE SOUZA, 1997; SINAI, 1997 e MAGNO *et al.*, 2005).

As moléculas candidatas envolvidas na interação de organelas com a MVP são as proteínas ROP2a, ROP2b e ROP8 (secretadas pelas róprias, que constituem uma família de cerca de 18 proteínas, com distintas funções na infecção). Essas moléculas atuam como mediadoras desta associação, via interações hidrofóbicas e iônicas (BECKERS *et al.*, 1997; SINAI e JOINER, 2001; NAKAAR *et al.*, 2003; EL HAJJ *et al.*, 2006, 2007; LABESSE *et al.*, 2009; REESE e BOOTHROYD, 2009; PERNAS *et al.*, 2014). PERNAS e BOOTHROYD (2010) relataram que a depleção dos genes para estas proteínas, em taquizoítos da cepa RH, mantém a associação da mitocôndria com a MVP, o que contraria os resultados descritos pelo grupo do Nakaar. Esses autores sugerem que tenha ocorrido uma depleção “off-target” de outros membros da grande família de proteínas da ROP2, gerando esse resultado conflitante. Independentemente dessa discussão a respeito da(s) molécula(s) responsável (eis) pela associação entre mitocôndrias da célula hospedeira e o VP, nossos dados obtidos com taquizoítos e bradizoítos não só comprovam a associação como, também, reforçam a ideia de que esse evento não seria ocasional (GOMES *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA, 2014; GARCIA, 2016;

TAHARA *et al.*, 2016; MARQUES, 2017). Mais recentemente, corroborando essa hipótese, foi identificado um fator de associação mitocondrial (TgMAF1) como uma molécula mediadora da associação mitocôndria - MVP de *T. gondii* (PERNAS *et al.*, 2014).

Além do RER e mitocôndrias associadas ao VP em HUVEC, a participação de corpúsculos lipídicos foi também evidenciada. Nós temos demonstrado que, em células musculares esqueléticas, além do recrutamento de organelas para o VP, ocorre um aumento no número e volume dos CL acompanhado pelo aumento da expressão da COX-2 e PGE₂, e sugerimos que este processo possa contribuir para o controle da síntese da IL-12 e do IFN- γ frente à infecção por *T. gondii* (GOMES *et al.*, 2014). Experimentos desenvolvidos pelo grupo de DaMatta (MOTA *et al.*, 2014) mostraram também um aumento no número de CL, acompanhado do aumento da produção de PGE₂ com concomitante redução da produção de NO, tornando os macrófagos menos microbicidas. No caso de HUVEC, esta associação foi mantida inclusive durante a diferenciação de taquizoítos para bradizoítos, nos seus diferentes estágios. A formação de CL induzida por infecção por patógenos foi proposta como parte do mecanismo de evasão do parasito (BOZZA *et al.*, 2007; MELO & DVORAK, 2012). Sem dúvida, a atenção dada a estas organelas é devido ao seu papel central em várias patologias, incluindo as infecciosas (BOZZA *et al.*, 2009, 2011; MELO e DVORAK, 2012; GOMES *et al.*, 2014; MEYERS *et al.*, 2017). Esta hipótese é bem fundamentada e deve ser investigada em diferentes modelos celulares, explorando essa interação durante a cistogênese do *T. gondii*, como uma ferramenta para o bloqueio do avanço da fase crônica da toxoplasmose. Assim, a associação direta de CL com VP sugere que *T. gondii* possa tirar vantagem das células hospedeiras, como uma fonte de energia extra e favorecer a sua sobrevivência e crescimento intracelulares.

Adicionalmente, a evidenciação da localização do Golgi próximo ao vacúolo parasitóforo em HUVEC pode estar relacionada à interceptação do tráfego de vesículas da célula hospedeira pelo parasito, permitindo a captação de nutrientes, especialmente lipídios (DE MELO E DE SOUZA, 1996; BISANZ *et al.*, 2006; COPPENS, 2006; ROMANO *et al.*, 2013). Essa associação se manteve por todo o período de análise da infecção, inclusive em parasitos em processo de degradação. ROMANO *et al.* (2013) demonstraram que o VP de *T. gondii* se localiza

preferencialmente perto do Golgi da célula hospedeira durante a infecção e permanece estreitamente associado à esta organela ao longo do desenvolvimento do ciclo lítico. O parasito fragmenta o Golgi em numerosas pequenas vesículas que rodeiam o VP, e as sequestra para dentro do VP. Uma vez marcadas com anticorpo contra Rab14, Rab30 ou Rab43, se colocam com esfingolípídios derivados do hospedeiro no espaço vacuolar. Os autores acreditam que os esfingolípídios eliminados contribuam para a replicação do parasito, pois qualquer alteração no seu metabolismo é prejudicial para o crescimento do *T. gondii*. Num estudo mais recente, NOLAN *et al.* (2015) compararam *Neospora* e *Toxoplasma*, dois parasitos coccídeos do filo Apicomplexa, quanto a capacidade de interagirem com Golgi da célula hospedeira. Foi observado que *Neospora* não é capaz de desmontar o Golgi, não usando essa via para captação de lipídios e que esta diferença deve refletir divergências nas vias evolucionárias desses parasitos parentes. Nossos estudos ultraestruturais com HUVEC deverão ser aprofundados, afim de melhor analisar a interação do Golgi com o VP.

Frente a um tipo celular como as HUVEC, que contém grande quantidade de glicogênio, nós adicionamos mais um dado da interação de estruturas celulares ao VP contendo *T. gondii*: grânulos de glicogênio foram visualizados no interior do vacúolo parasitóforo e na matriz vacuolar. Essa observação, ainda não descrita por outros autores, poderia contribuir para o metabolismo energético do parasito, como fonte de carboidratos. Essa hipótese carece de melhor fundamentação, tendo em vista que nem todos os tipos celulares com os quais o *T. gondii* interage tem essa fonte energética disponível.

Durante o desenvolvimento de taquizoítos em HUVEC, há no período de proliferação celular um aumento da rede túbulo-vesicular (RTV) como descrito em células epiteliais, musculares e astrócitos (MAGNO *et al.*, 2005b; LEMGRUBER *et al.*, 2008; De OLIVEIRA, 2014; GARCIA, 2016; MARQUES, 2017). É de amplo conhecimento que a MPV é modificada bioquimicamente por uma intensa exocitose de moléculas das róprias e dos grânulos densos (BROSSIER *et al.*, 2005), que as proteínas GRA2, GRA3 e GRA6 possuem um papel fundamental na formação dos túbulos, que darão origem à RTV madura, e que a GRA6 é responsável pela estabilização desta rede (MERCIER *et al.*, 2002; CAFFARO e BOOTHROYD, 2011). Além disso, várias dessas proteínas modificam a membrana do vacúolo

parasitóforo, através da formação de poros, permitindo a difusão bidirecional de moléculas de até 1.2 kDa, entre o vacúolo e o citoplasma da célula hospedeira (CESBRON-DELAUW, 1994; SCHWAB *et al.*, 1994). De fato, o aumento dessa rede durante o desenvolvimento do parasito deverá aumentar o trânsito de substâncias entre parasito e o citoplasma da célula hospedeira, como fonte de nutrientes e fatores necessários a manutenção de *T. gondii* intracelular.

As imagens indicativas da exocitose dos corpúsculos de Weibel-Palade, na presença de parasitos intracelulares, sugerem estar havendo ativação de HUVEC com a mobilização dessas organelas, atuando como uma resposta celular frente à infecção. Essa organela armazena diversos fatores importantes para a funcionalidade da célula endotelial e sua exocitose é mediada por diversos mediadores (LOWENSTEIN *et al.*, 2005). A resposta celular frente a esses mediadores pode variar de acordo com o subtipo de célula endotelial. Por exemplo, células da microvasculatura tem ativação induzida por trombina, resultando em efeitos pró-coagulante. Isso se dá pela expressão de canais de cálcio, que são presentes nas células localizadas na microcirculação e ausentes nas células de grandes veias (WU *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2007). O estado de ativação da célula endotelial desencadeia a liberação do CWP e do fator de von Willebrand e, em situações de ativação crônica do endotélio, os níveis de VWF no plasma são acentuadamente maiores, como demonstrado em pacientes infectados com Plasmodium, agente causador da malária (HOLLESTELLE *et al.*, 2006; DE MAST *et al.*, 2007). Não é esclarecido por qual mecanismo esse aumento ocorre. Sugere-se que seja pela liberação de citocinas inflamatórias ou pela estimulação direta de glóbulos vermelhos parasitados (DE MAST *et al.*, 2007). Investigar a ativação dos CWP e a produção de citocinas durante a interação de *T. gondii* com HUVEC é um desafio que deverá ser explorado.

Através da microscopia eletrônica de transmissão foi possível avaliar o destino intracelular desses parasitos. Após 96 horas foi observada a conversão espontânea de taquizoítos para bradizoítos, evidenciados pela presença de grânulos de aminopectina. No entanto, não foram observadas evidências da parede cística por essa metodologia. Desta forma, então, foi aplicada a análise por citoquímica utilizando marcador específico para a parede cística, tornando possível a confirmação do estabelecimento da cistogênese em HUVEC.

Alguns estudos sobre o estágio-conversão taquizoíta↔bradizoíta propõem que o tipo celular não influencia na formação de cistos teciduais (LINDSAY *et al.*, 1991). Esta proposta é sustentada por resultados mostrados em vários estudos onde a conversão pode ser induzida *in vitro* por mudanças na temperatura ou no pH do meio (SOETE *et al.*, 1994), por citocinas pró-inflamatórias (BOHNE *et al.*, 1994), ou deleção de nutrientes do meio (FOX *et al.*, 2004). SOETE *et al.* (1994) detectaram antígenos específicos para bradizoítos (BAG-1) e formação de estruturas císticas em culturas celulares das linhagens Vero e HFF infectadas com *T. gondii* (cepa RH), quando submetidas a estresses físicos e metabólicos. A falta de fatores físicos e químicos para indução da cistogênese (FERREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009a, b) empregando células musculares esqueléticas sugeriram que fatores inerentes ao tipo celular possam ser determinantes na formação de cistos. Em culturas primárias de células musculares esqueléticas infectadas com taquizoítos da cepa virulenta tipo I (RH) verificou-se a conversão de taquizoíta para bradizoíta na ausência de estímulos exógenos. Além disso, linhagens de células musculares mostram ser mais eficientes na capacidade de conversão quando comparadas às culturas de fibroblastos, reforçando a ideia de que o fenômeno de conversão do *T. gondii* está associado a outros fatores, como por exemplo, o microambiente celular onde a infecção se estabeleça (FERREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2008, 2009a, b). Esta especificidade remete à sugestão de que determinados microambientes apresentem características bioquímicas que favoreçam a persistência do parasitismo no hospedeiro, e tem sido bem estabelecida tanto em sistemas *in vitro* quanto *in vivo* (LÜDER *et al.*, 1999; ANDRADE *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2005; DI CRISTINA *et al.*, 2008; GUIMARÃES *et al.*, 2008, 2009; FERREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2008, 2009a, b; MELZER *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2011; TÁKACS *et al.*, 2012; SWIERZY e LÜDER, 2015; GOMES *et al.*, 2014; SOUTO *et al.*, 2016). Esse conjunto de estudos sugere que fatores inerentes ao tipo celular possam promover o estágio diferenciação do *T. gondii*, sem a necessidade da utilização de fatores indutores de estresse.

Outro aspecto que tem sido considerado nestas análises se refere a alta incidência de cistogênese, especificamente em certos tipos celulares. Tem sido proposto que esta predileção seria por células diferenciadas, justificando a

seleção pelo parasito por células musculares esqueléticas e neurônios para a manutenção do parasitismo no hospedeiro (SWIERZY e LÜDER, 2015). Esta hipótese não explica a eficiência da conversão de taquizoítos em bradizoítos em algumas linhagens de células epiteliais renais, como células Vero e 293T fibroblastos. Por exemplo, nas células tumorais com alta capacidade proliferativa, a cistogênese se estabelece muito bem, frente a diferentes formas infectantes e cepas de diversificado perfil genético de *T. gondii* (WEILHAMMER *et al.*, 2012; PAREDES-SANTOS *et al.*, 2013; de MUNO *et al.*, 2014, 2015; GARCIA, 2016). Este conjunto de dados corrobora a hipótese de que o tipo celular associado ao estado metabólico das células seja decisivo para o sucesso da manutenção do parasito no organismo infectado. Todos esses parâmetros reforçam a necessidade da elucidação desse processo com estudos mais direcionados para os eventos que ocorrem *in vivo*, explorando os aspectos inerentes a cada tipo celular envolvido na cistogênese.

Os ensaios para avaliar o destino intracelular do parasito em HUVEC foram realizados sem nenhuma manobra para induzir a cistogênese e, embora não tenha sido quantificado, podemos observar um número relevante de cistos nesse modelo celular. Nas nossas condições experimentais, o presente estudo evidenciou a capacidade do parasito de se converter para a forma bradizoíto e formar uma parede cística. Essa diferenciação garante, não só a sua sobrevivência no interior da célula, como a manutenção da infecção durante toda a gestação, e induz a uma questão de relevância no contexto da toxoplasmose congênita: ocorreria recrudescência desses cistos e uma retroalimentação da infecção durante todo o curso da gestação? Reforçando esse achado, em um estudo de caso, realizado com duas gestantes com toxoplasmose congênita, cistos foram encontrados na placenta e cordão umbilical (FERGUSON *et al.*, 2012). No entanto, não foi identificado o tipo celular que continha o cisto.

Desta forma, o estudo da cistogênese *in vitro* nesse modelo celular, tão importante na rota de transmissão vertical do parasito, abre novas perspectivas para o estudo dos aspectos moleculares que possam estar governando o estabelecimento da toxoplasmose congênita.

VII. CONCLUSÕES

(i) As condições de cultivo primário de HUVEC mantiveram as suas características morfológicas e funcionais ativas, como no sistema *in vivo*, reproduzindo inclusive, a biogênese de corpúsculos de Weibel-Palade;

(ii) HUVEC são susceptíveis à infecção pelo *T. gondii* por duas cepas polares, sustentando a replicação dos parasitos e ratificando, assim, o seu envolvimento como importante via de transmissão vertical da toxoplasmose;

(iii) HUVEC responde à infecção com a cepa ME-49 de *T. gondii*, como visto por análise ultraestrutural, com migração ativa de mitocôndrias, RER, corpúsculos lipídicos, glicogênio e algumas vezes Golgi para o VP. Esse recrutamento e

interação de organelas de HUVEC, no curso do estabelecimento do ciclo lítico, pode garantir o parasitismo por meio do trânsito de moléculas entre o ambiente vacuolar e o citoplasma da célula hospedeira;

(iv) Durante a infecção pelo *T. gondii* células endoteliais são ativadas, como demonstrado pela dinâmica de deslocamento dos corpúsculos de Weibel-Palade nas imediações do vacúolo parasitóforo e também em franco processo de exocitose;

(v) A cepa ME-49 de *T. gondii* é capaz de espontaneamente estabelecer a conversão taquizoíto-bradizoíto e a cistogênese em HUVEC, demonstrada pela primeira vez. O encistamento, nessa importante via de transporte da infecção para o feto, pode atuar como repositório de parasitos ao longo da gestação, potencializando por meio do rompimento dos cistos, re-infecções;

(vi) Este conjunto de dados abre perspectivas para o aprofundamento da interação *T. gondii*-HUVEC, explorando se a infecção: (a) interfere na biogênese de CL e CWP; (b) estimula a síntese e secreção de citocinas, do tipo IL-8, por CWP e, (c) modula a expressão de moléculas de adesão das HUVEC durante as diferentes etapas do processo de interação com *T. gondii* atuando como candidatas determinantes do destino intracelular do parasito, em particular no estabelecimento da cistogênese.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasi M.; Kowalewska-Grochowska K.; Bahar M.A.; Kilani R.T.; Winkler-Lowen B.; Guilbert L.J. (2003). Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis.*188: 608-16.

Abou-Bacar A.; Pfaff A.W.; Georges S.; Letscher-Bru V.; Filisetti D.; Villard O.; Antoni E.; Klein J.P.; Candolfi E. (2004). Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. *Infect Immun.* 72: 1397-401.

Aird WC. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 100: 158-73.

- Aird W.C. (2012). Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2: a006429.
- Alexander, D.L.; Mital, J.; Ward, G.E.; Bradley, P.; Boothroyd, J.C. (2005). Identification of the Moving Junction Complex of *Toxoplasma gondii*: A Collaboration between Distinct Secretory Organelles. *PLoS Pathog.* 1: e17.
- Albelda S.M.; Daise M.; Levine E.M.; Buck C.A. (1989) Identification and characterization of cell-substratum adhesion receptors on cultured human endothelial cells. *J Clin Invest.* 83: 1992-2002.
- Angeloni M.B.; Silva N.M.; Castro A.S.; Gomes A.O.; Silva D.A.; Mineo J.R.; Ferro E.A. (2009). Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo trophoblastic and HeLa cells are differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types. *Placenta.* 30: 785-91.
- Babich V.; Meli A.; Knipe L.; Dempster J.E.; Skehel P.; Hannah M.J.; Carter T. (2008). Selective release of molecules from Weibel-Palade bodies during a lingering kiss. *Blood.* 111: 5282-90.
- Baudin B.; Bruneel A.; Bosselut N.; Vaubourdolle M. (2007). A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc.* 2: 481-5.
- Barbosa, H. S.; Silva, M. F. F.; Guimaraes, E. V.; Carvalho, L.; Rodrigues, R. M. (2005). Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear localization. *J Parasitol.* 91: 182-184
- Barragan A.; Brossier F.; Sibley L.D. (2005). Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol.* 7: 561-8.
- Bartholo, Bárbara Raskovisch B.G. (2015). Toxoplasmose na gestação. Rev Hosp Universitário P. Ernesto.14
- Bazzoni, G. (2002). Analysis of intercellular adhesion molecules in endothelial cells. *Cell-Cell interactions. Practical approach*, 2nd ed. Oxf Uni Press NY. 46.37-46.
- Behnke M.S.; Radke J.B.; Smith A.T.; Sullivan W.J Jr.; White M.W. (2008). The transcription of bradyzoite genes in *Toxoplasma gondii* is controlled by autonomous promoter elements. *Mol Microbiol.* 68: 1502-18.
- Benedetto N.; Folgore A.; Ferrara C.; Moliterno M.; Galdiero F. (1997). Effects of alpha-adrenergic agonists on *Toxoplasma gondii* replication in human umbilical vein endothelial cells. *Pathol Biol.* 45: 9-18.
- Berriman J.A.; Li S.; Hewlett L.J.; Wasilewski S.; Kiskin F.N.; Carter T.; Hannah M.J.; Rosenthal P.B. (2009). Structural organization of Weibel-Palade bodies

revealed by cryo-EM of vitrified endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci.* 106: 17407-12.

Besteiro S.; Dubremetz J.F.; Lebrun M. (2011). The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell Microbiol.* 13: 797-805.

Bisanz C.; Bastien O.; Grando D.; Jouhet J.; Maréchal E.; Cesbron-Delauw M.F. (2006). *Toxoplasma gondii* acyl-lipid metabolism: de novo synthesis from apicoplast-generated fatty acids versus scavenging of host cell precursors. *Biochem J.* 394: 197-205.

Bessières M.H.; Berrebi A.; Rolland M.; Bloom M.C.; Roques C.; Cassaing S.; Courjault C.; Séguéla J.P. (2001). Neonatal screening for congenital toxoplasmosis in a cohort of 165 women infected during pregnancy and influence of in utero treatment on the results of neonatal tests. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 94: 37-45.

Bierhaus A.; Chen J.; Liliensiek B.; Nawroth P.P. (2000). LPS and cytokine-activated endothelium. *Semin Thromb Hemost.* 26: 571-87.

Bierly A.L.; Shufesky W.J.; Sukhumavasi W.; Morelli A.E.; Denkers E.Y. (2008). Dendritic cells expressing plasmacytoid marker PDCA-1 are Trojan horses during *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol.* 181: 8485-91.

Black M.W.; Boothroyd J.C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 607-23.

Blackman M.J.; Carruthers V.B. (2013). Recent insights into apicomplexan parasite egress provide new views to a kill. *Curr Opin Microbiol.* 16: 459-64.

Blader I.J.; Coleman B.I.; Chen C.T.; Gubbels M.J. (2015). Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. *Annu Rev Microbiol.* 69: 463-85.

Bohne, W.; Heesemann, J.; Gross, U. (1994). Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect Immun.* 62: 1761-67.

Bonfanti R.; Furie B.C.; Furie B.; Wagner D.D. (1989). PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood.* 73: 1109-12.

Boothroyd, J.C.; Dubremetz, J.F. (2008). Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol.* 6: 79-88.

Caldas, L.A.; Attias, M.; De Souza, W. (2009). Dynamin inhibitor impairs *Toxoplasma gondii* invasion. *FEMS Microb Letters*, 301, 1, 103-108.

- Cañedo-Solares, I; Calzada-Ruiz, M; Ortiz-Alegría, L.B; Ortiz-Muñiz, A.R; Correa, D. (2013). Endothelial cell invasion by *Toxoplasma gondii*: differences between cell types and parasite strains. *Parasitol. Res.* 112: 3029-33.
- Carmen, J.C.; Hardi, L; Sinai, A.P. (2006). *Toxoplasma gondii* inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway. *Cell. Microbiol.* 8: 301-15.
- Carruthers, V. B; Sibley, L.D. (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 3: 421–428.
- Carruthers, V; Boothroyd, J.C. (2007). Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 83–89.
- Carruthers, V.B. (2006). Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. *Int. J Parasit.* 36: 595-600.
- Carruthers, V.B; Tomley, F.M. (2008). Microneme proteins in apicomplexans. In: *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion*. Springer New York. 33-45.
- Castillo, C; Muñoz, L; Carrillo, I; Liempi, A; Gallardo, C; Galanti, N; Maya, J.D; et al. (2017). *Ex vivo* infection of human placental chorionic villi explants with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* induces different Toll-like receptor expression and cytokine/chemokine profiles. *Am J Reprod Immunol.* 41:205-12
- Chazov, E.I; Alexeev, A.V; Antonov, A.S; Koteliansky, V.E; Leytin, V.L; Lyubimova, E.V; Repin, V.S; et al. (1981). Endothelial cell culture on fibrillar collagen: model to study platelet adhesion and liposome targeting to intercellular collagen matrix. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78: 5603-07.
- Cines, Das B. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 91: 3527-61.
- Clark, R.A; Folkvord, J.M; Nielsen, L.D. (1986). Either exogenous or endogenous fibronectin can promote adherence of human endothelial cells. *J Cell Sci.* 1986: 82:263-280.
- Coppens, I. (2013). Targeting lipid biosynthesis and salvage in apicomplexan parasites for improved chemotherapies. *Nat Rev Microbiol.* 11: 823-35.
- Cortez, E; Stumbo, A.C; de Carvalho, T.M; Barbosa, H.S; Carvalho, L. (2005). NAD (P) H-oxidase presence in *Toxoplasma gondii* tachyzoite vacuole during interaction with IFN-gamma-activated human endothelial cells. *J Pararasitol.* 91: 1052-57.
- Cortina-Borja, M; Tan, H.K; Wallon, M; Paul, M; Prusa, A; Buffolano, W; Malm, G; et al. (2010). Prenatal treatment for serious neurological sequelae of congenital toxoplasmosis: an observational prospective cohort study. *PLoS Medicine.* 7: 10.

Da silva CL. 2013. Estudo do metabolismo mitocondrial e da resposta anti-apoptotica de células endoteliais humanas durante a evolução da infecção por taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. [dissertação] Universidade Estadual do Rio de Janeiro. (106 pgs)

Davies, P.F. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. (2009) Nature clinical practice. *Cardiovasc Med.* 6: 16-26.

De Melo, E.J; de Carvalho, T.U; de Souza, W. (1992). Penetration of *Toxoplasma gondii* into host cells induces changes in the distribution of the mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct.* 17: 311-7.

De Munro, R.M; Moura, M.A; de Carvalho, L.C; Seabra, S.H; Barbosa, H.S. (2014). Spontaneous cystogenesis of *Toxoplasma gondii* in feline epithelial cells *in vitro*. *Folia Parasitol.* 61: 113-

De Souza, W., dos Santos Martins-Duarte, É., Lemgruber, L., Attias, M., & Vommaro, R. C. (2010). Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. *Scientia Med.* 20: 131-43.

Dejana, E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. (2004) Nature reviews. *Mol, Cell Biol* 5: 261-70.

Dejana, E; Hirschi, K.K.; Simons, M. (2017). The molecular basis of endothelial cell plasticity. *Nat. Commun.* 8: 14361.

Dennis, M.K; Burai, R; Ramesh, C; Petrie, W.K; Alcon, S.N; Nayak, T.K; Bologna, C.G; et al. (2009). *In vivo* effects of a GPR30 antagonist. *Nat. Chem. Biol.* 5: 421-427.

Dimier, I.H; Bout, D.T. (1993). Co-operation of interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha in the activation of human umbilical vein endothelial cells to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. *Immunol*, 79: 336.

Dimmeler, S; Assmus, B; Hermann, C; Haendeler, J; Zeiher, A.M. (1998) Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells. *Circ. Res.* 83: 334-41.

Dubey, J.P. (2004) Toxoplasmosis-a waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.*126: 57–72.

Dubey, J.P. (1998). Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. *Parasitol.* 116: 43-50.

Dubey, J.P; Speer, C.A; Shen, S.K; Kwok, O.C; Blixt, J. (1997). A.Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol.* 83: 870-882.

- Dubey, J.P.; Frenkel, J.K. (1972). Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Euk. Microbiol.* 19: 155-177.
- Dubey, J.P. (1991). Toxoplasmosis: an overview. *South Asian J Trop Med Public Health.* 1: 88-92.
- Dunn, D; Wallon, M; Peyron, F; Petersen, E; Peckham, C; Gilbert, R. (1999). Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet.* 29: 1829-33.
- Dvorak, A.M.; Feng, D. (2001). The vesiculo–vacuolar organelle (VVO): a new endothelial cell permeability organelle. *J. Histochem. Cytochem.* 49: 419-31.
- Dzierszynski, F; Nishi, M; Ouko, L; Roos, D.S. (2004). Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eukaryot Cell* 3: 992-1003.
- Elgjo, R.F; Henriksen, T; Evensen, S.A. (1975). Ultrastructural identification of umbilical cord vein endothelium in situ and in culture. *Cell Tissue Res.* 162: 49-59.
- Endo, T; Sethik, K; Piekarski, G. (1989). *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages. *Exp. Parasitol.* 53: 179-188.
- Eriksson, E.E; Karlof, E; Lundmark, K; Rotzius, P; Hedin, U; Xie, X. (2005). Powerful inflammatory properties of large vein endothelium *in vivo*. *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* 25: 723-728.
- Félétou, M. (2011). The endothelium, Part I: Multiple functions of the endothelial cells--focus on endothelium-derived vasoactive mediators. In: Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function. Morgan & Claypool Life Sciences. 1-306.
- Ferguson D.J., Bowker C., Jeffery K.J., Chamberlain P, Squier W. (2012). Congenital toxoplasmosis: continued parasite proliferation in the fetal brain despite maternal immunological control in other tissues. *Clin. Infect. Dis.* 56: 204-8.
- Ferreira-da-Silva, M.D.F., Rodrigues, R.M., Andrade, E.F.D., Carvalho, L., Gross, U., Lüder, C.G., Barbosa, H.S. (2009). Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104, 196-200.
- Ferreira-da-Silva, M.D.F.F., Barbosa, H.S., Groß, U., & Lüder, C.G. (2008). Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biol.* 4: 824-34.
- Feustel, S. M., Meissner, M., & Liesenfeld, O. (2012). *Toxoplasma gondii* and the blood-brain barrier. *Virulence*, 3, 182–192.

- Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, Kriz W, Thurston G, Augustin HG. (2004) The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood*. 103: 4150-6
- Fox, B.A.; Gigley, J.P.; Gzik, D.J. (2004). *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Inter J. Parasitol.* 34: 323-31.
- Frank, P.G., Woodman, S.E., Park, D.S., Lisanti, M.P. (2003). Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterio. Throm Vasc Biol.* 23: 1161-68.
- Frazão-Teixeira E, Sundar N, Dubey JP, Grigg ME, de Oliveira FC. (2011). Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. *Vet. Parasitol.* 175: 33-9.
- Frenkel, J. K. (1973). *Toxoplasma* in and around us. *Biosce.* 23: 343-352.
- Furtado, J.M., Bharadwaj, A.S., Chipps, T.J., Pan, Y., Ashander, L.M., Smith, J.R. (2012). *Toxoplasma gondii* Tachyzoites Cross Retinal Endothelium Assisted by Intercellular Adhesion Molecule-1 *In Vitro*. *Immu Cell Biol* 90: 912–915.
- Galley H.F, Webster N.R. Physiology of the endothelium. (2004). *Br J Anaesth.* 93:105-13.
- Garcia MC. 2016. Avaliação estrutural de proteínas do citoesqueleto e de algumas de suas proteínas associadas em células musculares esqueléticas e epiteliais renais durante a cistogênese de *Toxoplasma gondii* [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (140 pgs).
- Gilbert R, Gras L. (2003). European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis Effect of timing and type of treatment on the risk of mother to child transmission of *Toxoplasma gondii*. 110:112-20.
- Ginimbrone M.A, Jr, Cotran R.S, Folkman J. (1974). Human vascular endothelial cells in culture. Gro and DNA synt. *J. Cell Biol.* 60:673-84.
- Goddard LM, Iruela-Arispe ML. (2013) Cellular and molecular regulation of vascular permeability. *Thromb Haemost*; 407-15.
- Gomes, A.F., Magalhães, K.G., Rodrigues, R.M., de Carvalho, L., Molinaro, R., Bozza, P.T., & Barbosa, H.S. (2014). *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN- γ and PGE₂. *Paras Vect*, 7, 47-59
- Gordon SL, Cousin MA. (2016). The iTRAPs: Guardians of Synaptic Vesicle Cargo Retrieval During Endocytosis. *Front Synaptic Neurosci.* 8:1.

- Grant D.S., Kleinman H.K., Martin G.R. (1990). The role of basement membranes in vascular development. *Ann N Y Acad Sci*; 588: 61-72
- Gras L, Wallon M, Pollak A, Cortina-Borja M, Evengard B, Hayde M, Petersen E, Gilbert R. (2005). European Multicenter Study on Congenital Toxoplasmosis. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. *Acta Paediatr*. 94; 1721-31.
- Groot H, Rauen U. (2007). Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant Proc*.4: 481-4.
- Guimarães, EV ; Carvalho, L; Barbosa, H.S. (2008). Primary culture of skeletal muscle cells as a model for studies of *Toxoplasma gondii* cystogenesis. *J. Parasitol*. 94: 72-83.
- Günzel D., Yu A.S. (2012). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol. Rev*. 93: 525-69.
- Haberichter, S.L., Merricks, E.P., Fahs, S.A., Christopherson, P.A., Nichols, T.C., Montgomery, R.R. (2005). Re-establishment of VWF-dependent Weibel-Palade bodies in VWD endothelial cells. *Blood*, 105: 145-152.
- Halonen, S.K.; Weiss, L.M. (2013). Toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol*. 114: 125–145.
- Harker, K.S.; Ueno, N.; Lodoen, M.B. (2015). *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. *Parasite Immunol*. 37: 141-149
- Harrison, D.G.; Widder, J.; Grumbach, I.; Chen, W.; Weber, M.; Searles, C. (2006). Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation. *J Intern Med*. 259: 351-363
- Harrison-Lavoie, K.J.; Michaux, G.; Hewlett, L.; Kaur, J.; Hannah, M.J.; Lui-Roberts, W.W.; *et al.* (2006). P-selectin and CD63 use different mechanisms for delivery to Weibel-Palade bodies. *Traffic*. 7: 647–662
- Hide, G.; Morley, E.K.; Hughes, J.M.; Gerwash, O.; Elmahaishi, M.S.; Elmahaishi, K.H.; *et al.* (2009). Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol*. 136: 1877-85
- Hill, D.; Dubey, J.P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 8: 634-640
- Hotop, A.; Hlobil, H.; Gross, U. (2012). Efficacy of rapid treatment initiation following primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis*. 54: 1545-1552

- Howe, D.K.; Sibley, L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* 172: 1561-1566
- Hunter, C.A.; Subauste, C.S.; Van Cleave, V.H.; Remington, J.S. (1994). Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun.* 62: 2818-24.
- Huynh, M.H.; Carruthers, V.B. (2006). Toxoplasma MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. *PLoS Pathog.* 2: e84
- Iruela-Arispe, M. L.; Beitel, G.J. (2013). Tubulogenesis. *Development.* 140: 2851-2855
- Jackson, M.H; Hutchison, W.M. (1993). Unwanted cats—physical condition, Toxoplasma infection and ectoparasites. *Brit. Vet. J.* 149: 295-7.
- Jacquemin, P; Yoshitomi, H; Kashima, Y; Rousseau, G.G; Lemaigre, F.P; Zaret K.S. (2006). An endothelial-mesenchymal relay pathway regulates early phases of pancreas development. *Develop Biol,* 290: 189-199.
- Jaffe, E.A.; Hoyer, L.W; Nachman, R.L. (1973). Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J. Clin Invest.* 52: 27-57.
- Jimenez, J.J; Jy, W; Mauro, LM; Soderland, C; Horstman, LL; Ahn, YS. (2003). Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Cytotechnology.* 109: 175-180.
- Jones, J; Lopez, A; Wilson, M. (2003). Congenital toxoplasmosis. *Am Family Phys.* 67: 2131-46.
- Jones; Thomas, C.; Yeh; Shirley; Hirsch; James G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells: I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J. Exp. Med.* 136: 1157.
- Kafsack, B. F; Pena, J. D; Coppens, I; Ravidran, S; Boothroyd, J. C; Carruthers V. B. (2009) Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science* 323: 530-3.
- Khan, I.A.; Matsuura, T; Kasper, L.H. (1994). Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 62:1639-64.
- Khan, A; Jordan, C; Muccioli, C; Vallochi, A.L; Rizzo, L.V; Belfort, R Jr; Vitor R.W; et al. (2006) Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerging Infect. Dis.* 12: 942.-9

- Kieffer, F; Wallon, M; Garcia, P; Thulliez, P; Peyron, F; Franck, J. (2008). Risk factors for retinochoroiditis during the first 2 years of life in infants with treated congenital toxoplasmosis. *Pediatric. Infect. Dis. J.* 27: 27-32.
- kirchhausen, T Macia, E; Pelish, H.E. (2008). Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Methods in Enzym.* 438: 77-93
- Kobayashi, T; Vischer, U.M; Rosnoblet, C; Lebrand, C; Lindsay, M; Parton, R.G; Kruihof, E.K; et al. (2000). The tetraspanin CD63/lamp3 cycles between endocytic and secretory compartments in human endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 11: 1829-43.
- Kleinman, H.K; McGarvey, M.L; Liotta, L.A; Robey, P.G; Tryggvason, K; Martin, G.R. (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochem.* 21: 6188-93.
- Konradt, C; Ueno, N; Christian, D.A; DeLong, J.H; Pritchard, G.H; Herz, J; Bzik, D.J; et al. (2016). Endothelial cells are a replicative niche for entry of *Toxoplasma gondii* to the central nervous system. *Nat Microbiol.* 1: 16001.
- Koppe, J.G.; Loewer-Sieger, D.H.; de Roever-Bonnet, H. (1986). Results of 20-year follow-up of congenital toxoplasmosis. *Lancet.* 327: 254-256.
- Kraus, A.A; Raftery, M.J; Giese, T; Ulrich, R; Zawatzky, R; Hippenstiel, S; Suttorp, N; et al. (2004). Differential antiviral response of endothelial cells after infection with pathogenic and nonpathogenic hantaviruses. *J. Virol.* 78: 6143-50.
- Kumar, S; Maxwell, I.Z; Heisterkamp, A; Polte, T.R; Lele, T.P; Salanga, M; Mazur, E; et al(2006). Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics. *Biophys. J.* 90: 3762-73.
- Lachenmaier, S.M; Deli, M.A; Meissner, M; Liesenfeld, (2011). O. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood–brain barrier. *J. Neuroimmunol.* 232: 119-130.
- Laliberte, J; Carruthers; Vernon B. (2008). Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell. Mol Life Scienc.* 65: 1900-15.
- Lambert, H; Hitziger, N; Dellacasa, I; Svensson, M; Barragan, A. (2006) Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell. Microbiol.* 8: 1611-23.
- Lappalainen, M; Koskela, P; Koskiniemi, M; Ammälä, P; Hiilesmaa, V; Teramo, K; Raivio, K.O; et al. (1993) Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. *J. Infect. Dis.* 167: 691-7.

Laurens, N; Van Hinsbergh, V.W. (2004). Isolation, purification and culture of human micro- and macrovascular endothelial cells. Springer Lab Manual, Springer; 3-13.

Lavine, M.D; Arrizabalaga, G. (2007). Invasion and egress by the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*: potential targets for the development of new antiparasitic drugs. *Curr. Pharm. Des.* 13: 641–51.

Lebbink, M.N/ Jiménez N; Vocking, K; Hekking, L.H; Verkleij, A.J; Post, J. A. (2010). Spiral coating of the endothelial caveolar membranes as revealed by electron tomography and template matching. *Traffic* 11:138-50.

Leewis, L.J; Hoak, J.C; Maca, R.D; Fry, G.L. (1973). Replication of human endothelial cells in culture. *Science.* 181: 453–4.

Leroux, L.P; Dasanayake, D; Rommereim, L.M; Fox, B.A; Bzik, D.J; Jardim, A; Dzierszynski, F.S. (2015) Secreted *Toxoplasma gondii* molecules interfere with expression of MHC-II in interferon gamma-activated macrophages. *Int. J Parasitol* 45: 319-32.

Lindsay, D.S; Speer, C.A; Toivio-Kinnucan, M.A; Dubey, J.P; Blagburn, B.L. (1993). Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. *Am J. Vet. Res.* 54: 103-6.

Lindsay, D.S; Dubey, J.P; Blagburn, B.L; Toivio-Kinnucan, M. (1991) Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. *J. Parasitol.* :126-32.

Lowenstein, C.J; Morrell, C.N; Yamakuchi, M. (2005). Regulation of Weibel–Palade body exocytosis. *Trends Cardiovasc. Med.* 15: 302-308.

Maciag, T; Hoover, G.A; Stemerman, M.B; Weinstein, R. (1981). Serial propagation of human endothelial cells in vitro. *J Cell Biol.* 91:420–426.

Magno, R.C; Lemgruber, L; Vommaro, R.C; De Souza, W; Attias, M.(2005). Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc. Res. Techn.* 67: 45-52.

Mai J, Virtue A, Shen J, Wang H, Yang XF. (2003). An evolving new paradigm: endothelial cells--conditional innate immune cells. *J. Hematol. Oncol.* 22: 61.

Manger, I.D; Hehl, A; Parmley, S; Sibley, L.D; Marra, M; Hillier, L; Waterston, R; et al. (1998). Expressed sequence tag analysis of the bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*: identification of developmentally regulated genes. *Infect. Immun.* 66: 1632-37.

Mannconi, F; Markham, R; Fraser, I.S. (2000). Culturing endothelial cells of microvascular origin. *Methods Cell Sci.* 22: 89–99.

- Marin, V; Kaplanski, G; Gres, S; Farnarier, C; Bongrand, P.(2001). Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J Immunol Methods*. 254:183-90.
- MArtins-Green, M; Petreaca, M; Yao, M. (2008). An assay system for *in vitro* detection of permeability in human “endothelium” *Methods Enzymol*.443:137-53.
- Maruyama, Yuji. (1963). The human endothelial cell in tissue culture. *Cell Tissue Res*. 60: 69-79.
- McAuley; James, B. (2014). Congenital toxoplasmosis. *J. Pediatric. Infect. Dis. Soc*. 3: 30-35.
- McHugh, T.D; Gbewonyo, A; Johnson, J.D; Holliman, R.E; Butcher, P.D. (1993). Development of an *in vitro* model of *Toxoplasma gondii* cyst formation. *FEMS Microbiol Letters*. 114:325-32.
- McLeod, R; Boyer, K; Karrison, T; Kasza, K; Swisher, C; Roizen, N; Jalbrzikowski, J; et al. (2004). Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981–2004.
- Mehta, D; Malik, A.B. (2006) Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Phyl Rev*, 86: 279-367.
- McEver, R.P; Beckstead, J.H; Moore, K.L; Marshall-Carlson, L; Bainton, D.F. (1989) GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest*. 84: 92.
- Mercier, C; Dubremetz, J.F; Rauscher, B; Lecordier, L; Sibley, L.D; Cesbron-Delauw, M.F.(2002) Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol. Biol. Cell*. 13: 2397-409.
- Metcalf, D.J; Nightingale, T.D; Zenner, H.L; Lui-Roberts, W.W; Cutler, D.F. (2008) Formation and function of Weibel-Palade bodies. *J. Cell Sci*. 121: 19-27.
- Millán, J; Cain, R.J; Reglero-Real, N; Bigarella, C; Marcos-Ramiro, B; Fernández-Martín L, Correas, I; et al.(2010) Adherens junctions connect stress fibers between adjacent endothelial cells. *BMC Biol*. 8-11.
- Millán, J; Hewlett, L; Glyn, M; Toomre, D; Clark, P; Ridley, AJ .(2006) Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola-and F-actin-rich domains. *Nat. Cell Biol*. 8: 113.
- Mondragon, R; Frixione, E. (1996). Ca²⁺ Dependence of Conoid Extrusion in *Toxoplasma gondii* Tachyzoites. *J Euk Microbiol*. 43: 120-7.
- Montoya, J.G; Liesenfeld O (2004).Toxoplasmosis. *Lancet*. 363:1965-76.

- Mordue, D.G; Sibley, L.D. (1997). Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J. Immun.* 159: 4452-59.
- Morisaki, J.H; Heuser, J.E.; Sibley, L.D. (1995). Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J. Cell Sci.* 108: 2457-64.
- Mota, L.A; Roberto Neto, J; Monteiro, V.G; Lobato, C.S; Oliveira, M.A; D; D'Ávila, H; et al. (2014). Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associate with the parasitophorous vacuole and decrease their microbicidal capacity against *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 109: 767-774.
- Mourik, M.J; Valentijn, J.A; Voorberg, J; Koster, A.J; Valentijn, K.M; Eikenboom, J.(2013) von Willebrand factor remodeling during exocytosis from vascular endothelial cells. *J Thrombosis Haemostasis*, 11: 2009-19.
- Nagamune, K; Hicks, L.M; Fux, B; Brossier, F; Chini, E.N; Sibley, L.D. Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. (2008) *Nature*. 451 207.
- Naguleswaran, A; Elias, E.V; McClintick, J; Edenberg, H.J; Sullivan, W.J Jr. (2010). *Toxoplasma gondii* lysine acetyltransferase GCN5-A functions in the cellular response to alkaline stress and expression of cyst genes. *PLoS Pathog*, 6: p.1001232.
- Nahman, R.L; Jaffe, E.A. (2004). Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology. *J Clin Invest.* 114:1037–1040
- Nicolle, C; Manceaux, L. (1908). Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci* 147: 736.
- Nightingale, T; Cutler, D. (2013). The secretion of von Willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story. *J Thrombosis Haemostasis*. 11: 192-201.
- Nowakowska D, Wujcicka W, Sobala W, Spiewak E, Gaj Z, Wilczyński J. (2014). Age-associated prevalence of *Toxoplasma gondii* in 8281 pregnant women in Poland between 2004 and 2012. *Epidemiol Infec.* 142: 656-61.
- Oliveira Gomes, A; de Oliveira Silva, D.A; Silva, N.M; de Freitas Barbosa, B; Franco, P.S; Angeloni, M.B; Fermino, M.L; et al. (2011). Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. *Am. J Pathol.* 178: 2792-2801.
- Ortiz-Alegría, L.B; Caballero-Ortega, H; Cañedo-Solares, I; Rico-Torres, C.P; Sahagún-Ruiz, A; Medina-Escutia, M.E; Correa, D. (2010). Congenital

toxoplasmosis: candidate host immune genes relevant for vertical transmission and pathogenesis. *Genes Immun.* 11: 363-73.

Øynebråten, I; Bakke, O; Brandtzaeg, P; Johansen, F.E; Haraldsen, G. (2004). Rapid chemokine secretion from endothelial cells originates from 2 distinct compartments. *Blood*, 104: 314-20.

Oz, H.S. (2014). Maternal and congenital toxoplasmosis, currently available and novel therapies in horizon. *Front Microbiol.* 5.

Oz, H.S.; Tobin, T. (2012). Atovaquone ameliorate gastrointestinal Toxoplasmosis complications in a pregnancy model. *Med Sci Moni.*;18: BR337.

Paquet, C; Yudin, M.H; (2013). Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. Toxoplasmosis in pregnancy: prevention, screening, and treatment. *J. Obst Gynaec. Can.*, 35: 78-79.

Paredes-Santos, T.C; De Souza, W; Attias, M. (2012). Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. *J Struct Biol.* 177:420-30.

Partridge, C.A.; Jeffrey, J.J.; Malik, A.B. (1993). A 96-kDa gelatinase induced by TNF-alpha contributes to increased microvascular endothelial permeability. *Am J Phys-Lung Cell. Mol Phys.* 265: L438-L447,

Peng, H.J; Chen, X.G; Lindsay, D.S. (2011). A Review: Competence, Compromise, and Concomitance-reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. *J. Parasitol.* 97: 620-8.

Pfaff A.W; Georges, S; Abou-Bacar, A; Letscher-Bru, V; Klein, J.P; Mousli, M; Candolfi, E. (2005). *Toxoplasma gondii* regulates ICAM-1 mediated monocyte adhesion to trophoblasts. *Immun. Cell Biol.* 83: 483-9

Polacek, D; Bech, F; McKinsey, J.F; Davies, P.F. (1997) Connexin43 gene expression in the rabbit arterial wall: effects of hypercholesterolemia, balloon injury and their combination. *J. Vasc. Res.* 34: 19-30.

Pomares, C; Zhang, B; Arulkumar, S; Gonfrier, G; Marty, P; Zhao, S; Cheng, S; Tang, M; Dai, H; Montoya, J.G. (2017). Validation of IgG, IgM multiplex plasmonic gold platform in French clinical cohorts for the serodiagnosis and follow-up of *Toxoplasma gondii* infection. *Diag Micro Infec Dis.* 87: 213-218,

Prusa, A.R; Kasper, D.C; Pollak, A; Gleiss, A; Waldhoer, T; Hayde, M. (2014).The Austrian toxoplasmosis register, 1992–2008. *Clin. Infect. Dis.* 60: e4-e10,

Radke, J.R; White, M.W. (1998). A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol Biochem. Parasitol.* 94: 237-247.

- Radke, J.R; Guerini, M.N; Jerome, M; White, M.W. (2003). A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 131: 119-127.
- Rajendran, P; Rengarajan, T; Thangavel, J; Nishigaki, Y; Sakthisekaran, D; Sethi, G; Nishigaki, I. (2013). The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* 9: 1057-69.
- Reider, A; Wendland, B. (2011). Endocytic adaptors–social networking at the plasma membrane. *J Cell Sci* 124: 1613-22.
- Remington, J; Klein, G; Wilson, C; Baker, C; editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2006. pp. 947–1091.
- Richard, A; Stéphanie. (2017). AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci* 201.
- Robbins, J.R; Zeldovich, V.B; Poukchanski, A; Boothroyd, J.C; Bakardjiev, A.I. (2012) Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 80: 418-428.
- Roiko, M.S; Carruthers, V.B. (2009). New roles for perforins and proteases in apicomplexan egress. *Cell. Microbiol.* 11: 1444–52.
- Roiko, M.S; Carruthers, V.B. (2013). Functional dissection of *Toxoplasma gondii* perforin-like protein 1 reveals a dual domain mode of membrane binding for cytolysis and parasite egress. *J Biol Chem* 288: 8712-25.
- Roiko, M.S.; Svezhova, N; Carruthers, V.B. (2014). Acidification activates *Toxoplasma gondii* motility and egress by enhancing protein secretion and cytolytic activity. *PLoS Pathog.* 10: e1004488.
- Lui-Roberts, W.W; Collinson, L.M; Hewlett, L.J; Michaux, G; Cutler, D.F. (2005). An AP-1/clathrin coat plays a novel and essential role in forming the Weibel-Palade bodies of endothelial cells. *J Cell Biol* 170: 627-636.
- Roman de W.T; Rondaij, M.G; Hordijk, P.L; Voorberg, J; van Mourik, J.A. (2003). Real-time imaging of the dynamics and secretory behavior of Weibel-Palade bodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;23:755–761
- Romano, J.D; Sonda, S; Bergbower, E; Smith, M.E; Coppens, I. (2003). *Toxoplasma gondii* salvages sphingolipids from the host Golgi through the rerouting of selected Rab vesicles to the parasitophorous vacuole. *Mol Biol Cell* 24: 1974-95.
- Rommereim, L.M; Bellini, V; Fox, B.A; Pètre, G; Rak, C; Touquet, B; Aldebert, D;

- et al. (2016). Phenotypes associated with knockouts of eight dense granule gene loci (GRA2-9) in virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS one*, 11, 7.
- Rondaij, M.G; Bierings, R; Kragt, A; van Mourik, J.A; Voorberg, J.. (2006). Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler. Throm. Vas Biol.* 26: 1002-1007.
- Rosowski, E. E., Lu, D., Julien, L., Rodda, L., Gaiser, R. A., Jensen, K. D., & Saeij, J. P. (2011). Strain-specific activation of the NF- κ B pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *J. Exp Med* 208: 195-212.
- Saeij, J.P; Boyle, J.P; Grigg, M.E; Arrizabalaga, G; Boothroyd, J.C. (2005). Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. *Infect. Immun.* 73: 695-702.
- Scarfo, L.M; Weller, P.F; Farber, H.W. (2001) Induction of endothelial cell cytoplasmic lipid bodies during hypoxia. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 280: H294-H301.
- Schlüter, D; Däubener, W; Schares, G; Groß, U; Pleyer, U; Lüder, C. (2014). Animals are key to human toxoplasmosis. *Int J Med Microbiol.* 304: 917-929.
- Sheldon R, Moy A, Lindsley K, Shasby S, Shasby DM. (1993). Role of myosin light-chain phosphorylation in endothelial cell retraction. *Am J Physiol.* 265: 606-12.
- Shen, B; Sibley, L.D. (2012). The moving junction, a key portal to host cell invasion by apicomplexan parasites. *Curr Opin Microbiol.* 15: 449-455.
- Shiono, Y; Mun, H.S; He, N; Nakazaki, Y; Fang, H; Furuya, M; Aosai, F; Yano A. (2007). Maternal–fetal transmission of *Toxoplasma gondii* in interferon- γ deficient pregnant mice. *Parasitol. Intr.* 56: 141-148.
- Shrikant P, Chung IY, Ballestas ME, Benveniste EN. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interferon-gamma in astrocytes. *J Neuroimmunol.* 51: 209-20.
- Simionescu, M; Simionescu, N; Palade, G.E. (1975). Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature. *J. Cell Biol.* 67: 863-885.
- Sinai, A.P; Joiner, K.A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol.* 154: 95-108.
- Sinai, A.P; Webster, P; Joiner, K.A. (1997). Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci.* 110: 2117-28.

- Singh, S. (2016). Congenital toxoplasmosis: Clinical features, outcomes, treatment, and prevention. *Trop Parasitol* 6: 113.
- Smeets, E. F., von Asmuth, E. J., van der Linden, C. J., Leeuwenberg, J. F., & Buurman, W. A. (1992). A comparison of substrates for human umbilical vein endothelial cell culture. *Biot Hist.* 67: 241-250.
- Smith, J. R., Franc, D. T., Carter, N. S., Zamora, D., Planck, S. R., & Rosenbaum, J. T. (2004). Susceptibility of retinal vascular endothelium to infection with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Invest Ophth Visual Sci.* 45: 1157-1161.
- Soete, M; Fortier, B; Camus, D; Dubremetz, J.F. (1993) *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro. *Exp. Parasitol.* 76: 259-264.
- Soldati, D; Dubremetz, J.F; Lebrun, M. (2001) Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 31: 1293-302.
- Splendore, A. (1908). Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uoma. Nota preliminare. *Rev Soc Sci Sao Paulo* 3: 109-12.
- Stevens, T; Garcia, J.G; Shasby, D.M; Bhattacharya, J; Malik, A.B. (2000). Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279: L419–22
- Stumbo, AC; Barbosa HS; Carvalho TM; Porto LC; Carvalho Ld. (2002) Anionic sites, fucose residues and class I human leukocyte antigen fate during interaction of *Toxoplasma gondii* with endothelial cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97:517-22
- Stumbo, AC; Cortez, E; Rodrigues, C.A; Henriques, MD; Porto, L.C; Barbosa, H.S; Carvalho, L. (2008). Mitochondrial localization of non-histone protein HMGB1 during human endothelial cell-*Toxoplasma gondii* infection. *Cell Biol. Int.* 32: 235-238.
- Sumpio, B.E; Riley, J.T; Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *Inter. J Biochem Cell Biol.* 34: 1508-1512.
- Syrocot (Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis) study group, Thiébaud, R; Leproust, S; Chêne, G; Gilbert, R. 2007. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *Lancet* 369:115-122.
- Tangri, S; Wegmann, T.G; Lin, H; Raghupathy, R. (1994). Maternal anti-placental reactivity in natural, immunologically-mediated fetal resorptions. *J Immun.* 152: 4903-11.

- Tardieux, I; Baum, J. (2016). Reassessing the mechanics of parasite motility and host-cell invasion. *J Cell Biol.* 214: 507-515.
- Taubert, A; Krüll, M; Zahner, H; Hermosilla, C. (2006). *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections of bovine endothelial cells induce endothelial adhesion molecule gene transcription and subsequent PMN adhesion. *Vet. Immun Immunopathol* 112: 272-283.
- Tenter, A.M; Heckeroth, A.R; Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30: 1217-58.
- Trepels, T; Zeiher, A.M; Fichtlscherer, S. (2006). The endothelium and inflammation. *Endothelium* 13: 423-429.
- Thompson, P.W; Randi, A.M; Ridley, A.J. (2002). Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not ICAM-2, activates RhoA and stimulates c-fos and rhoA transcription in endothelial cells. *J. Immun.* 169: 1007-1013.
- Utgaard JO, Jahnsen FL, Bakka A, Brandtzaeg P, Haraldsen G. (1998). Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J Exp Med.* 2: 1751-6
- Valbuena G, Walker DH. (2006). The endothelium as a target for infections. *Annu Ver Pathol.* 1:171-98
- Valentijn KM, Valentijn JA, Jansen KA, Koster AJ.(2008)A new look at Weibel-Palade body structure in endothelial cells using electron tomography. *J Struct Biol.* 161: 447-58.
- Valentijn KM, van Driel LF, Mourik MJ, Hendriks GJ, Arends TJ, Koster AJ, Valentijn JA.(2010) Multigranular exocytosis of Weibel-Palade bodies in vascular endothelial cells. *Blood* 116:1807-16
- Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, Voorberg J, Eikenboom J.(2011) Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood.* 117: 5033-43.
- van Mourik JA, Boertjes R, Huisveld IA, Fijnvandraat K, Pajkrt D, van Genderen PJ, Fijnheer R.(1999). von Willebrand factor propeptide in vascular disorders: A tool to distinguish between acute and chronic endothelial cell perturbation. *Blood.* 94:179-85.
- Vestweber D, Broermann A, Schulte D. (2010). Control of endothelial barrier function by regulating vascular endothelial-cadherin. *Curr Opin Hematol.* 17:230-6.
- Vidal JE, Hernandez AV, de Oliveira AC, Dauar RF, Barbosa SP Jr, Focaccia R. (2005). Cerebral toxoplasmosis in HIV-positive patients in Brazil: clinical features

and predictors of treatment response in the HAART era. *AIDS Patient Care* 19: 626-34.

Vischer UM, Barth H, Wollheim CB. (2000) Regulated von Willebrand factor secretion is associated with agonist-specific patterns of cytoskeletal remodeling in cultured endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 883-91.

Wang Z, Cai W, Hu S, Xia Y, Wang Y, Zhang Q, Chen L.(2017). A Meta-Analysis of Circulating Microvesicles in Patients with Myocardial Infarction. *Arq Bras Cardiol.* 10-20.

Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. (1982). Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol.* 95: 355-60.

Wallez Y, Huber P. (2008). Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1778: 794-809.

Wallon M, Peyron F, Cornu C, Vinault S, Abrahamowicz M, Kopp CB, Binquet C. (2013). Congenital toxoplasma infection: monthly prenatal screening decreases transmission rate and improves clinical outcome at age 3 years. *Clin Infect Dis.* 56: 1223-31.

Webster JP, Kaushik M, Bristow GC, McConkey GA. (2013). *Toxoplasma gondii* infection, from predation to schizophrenia: can animal behaviour help us understand human behaviour? *J Exp Biol.* 216: 99-112.

Weibeller, Palade GE. (1964). New Cytoplasmic components in arterial endothelial. *Jcell Biol.* 23: 101-12.

Weiss LM, Kim K. (2000). The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci.* 5: 391-405.

White MW, Radke JR, Radke JB. (2014). Toxoplasma development - turn the switch on or off? *Cell Microbiol.* 16: 466-72.

Woodman JP, Dimier IH, Bout DT. (1991). Human endothelial cells are activated by IFN γ to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. Inhibition is due to a different mechanism from that existing in mouse macrophages and human fibroblasts. *J Immunol.* 147: 2019-23.

Wu HM, Huang Q, Yuan Y, Granger HJ. (1996). VEGF induces NO-dependent hyperpermeability in coronary venules. *Am J Physiol.* 271: 2735-9.

Wu KK, Thiagarajan P. (1996). Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med.* 47: 315-31.

- Wujcicka, W., Wilczyński, J., & Nowakowska, D. (2014). Do the placental barrier, parasite genotype and Toll-like receptor polymorphisms contribute to the course of primary infection with various *Toxoplasma gondii* genotypes in pregnant women? *Euro Journal of Clinical Micro Infec Dis.* 33: 703–709.
- Yamamoto M, Takeda K. (2012) Inhibition of ATF6 β -dependent host adaptive immune response by a *Toxoplasma* virulence factor ROP18. *Virulence.* 3: 77-80.
- Yang CD, Chang GN, Chao D. (2003). Protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice induced by the SAG2 internal image of anti-idiotypic antibody. *Parasitol Res.* 9: 452-7.
- Yolken RH, Dickerson FB, Fuller Torrey E. (2009). *Toxoplasma* and Schizophrenia *Paras.Immunol.* 31: 706-15
- Youn JH, Nam HW, Kim DJ, Park YM, Kim WK, Kim WS, Choi WY.(1991) Cell cycle-dependent entry of *Toxoplasma gondii* into synchronized HL-60 cells. *Kisaengchunghak Chapchi.* 29: 121-8.
- Zamora Do, Rosenbaum JT, Smith JR.(2008). Invasion of human retinal vascular endothelial cell by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *BR J Ophthalmol* 92: 852-5
- Zenner HL, Collinson LM, Michaux G, Cutler DF. (2007) High-pressure freezing provides insights into Weibel-Palade body biogenesis. *J Cell Sci.*120: 2117-25.