

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL**  
**APLICADAS**

**MARISOL PATRICIA PALLETE BRICEÑO**

**Infecção por *Toxoplasma gondii* promove a disfunção da barreira epitelial na linhagem de células Caco-2**

**UBERLÂNDIA**

**MARÇO 2015**

**MARISOL PATRICIA PALLETE BRICEÑO**

**Infecção por *Toxoplasma gondii* promove a disfunção da barreira epitelial na linhagem de células Caco-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neide Maria da Silva

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Wânia Rezende Lima

**UBERLÂNDIA**

**MARÇO 2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

B849i  
2015      Briceño, Marisol Patricia Pallete, 1988-  
            Infecção por *Toxoplasma gondii* promove a disfunção da barreira  
            epitelial na linhagem de células Caco-2 / Marisol Patricia Pallete  
            Briceño. - 2015.  
            57 f. : il.

Orientadora: Neide Maria da Silva.

Coorientadora: **Wânia Rezende Lima.**

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Células -  
Teses. 4. Polaridade (Biologia) - Teses. I. Silva, Neide Maria da. II.  
**Lima, Wânia Rezende.** III. Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.  
IV. Título.

*A mis padres José e Ruth que me apoyaron, aconsejaron y que estuvieron siempre conmigo  
en los momentos felices e difíciles a pesar de la distancia.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a todas as pessoas maravilhosas que conheci nesses dois anos no Brasil, que me apoiaram e compartilharam momentos alegres, divertidos e difíceis.

Agradeço à Profa. Dra. Neide Maria da Silva, minha orientadora, por ter a paciência, exigência e ter-me ensinado muitos aspectos em relação à pesquisa.

Agradeço à Dra. Wânia Rezende Lima, minha co-orientadora por ser sempre exigente comigo no momento de trabalhar, por me escutar sempre em português e espanhol, por me aconselhar sempre e me acalmar nos momentos difíceis.

Agradeço a todos os meus amigos e colegas do laboratório IMPAT: Nathy, Layane, Romulo, Mayara, Natália, Yusmaris, Marcos Paulo, Mário, Loyane, Paulo Victor, Estér e Priscila por ter me ajudado e apoiado para finalizar este trabalho, sem vocês não estaria escrevendo os agradecimentos.

Agradeço a Valentina por ter sido uma amiga incondicional nesse tempo que descobrimos o fato de morar fora de nossos países e viver momentos inesquecíveis. Embora cada uma esteja voltando para casa, sempre vamos ter essa amizade verdadeira.

Agradeço a Lou por ser um amigo de verdade para toda a minha vida.

Agradeço aos órgãos de apoio financeiro: FAPEMIG, Capes e CNPq por toda ajuda financeira que obtivemos durante estes dois anos do mestrado.

Por fim, agradeço à OEA por ter me dado a oportunidade de estudar no Brasil e à Universidade Federal de Uberlândia por todo conhecimento e experiência que adquiri.

## Resumo

*Toxoplasma gondii*, um parasito do filo Apicomplexa, é um patógeno intracelular obrigatório sendo responsável por 10-50% de infecções humanas em todo mundo. Portanto, é de se esperar que componentes tanto do parasito quanto da célula hospedeira auxiliem *T. gondii* na invasão ao epitélio intestinal. Embora, os mecanismos pelos quais o parasito estabelece a infecção no trato intestinal ainda não estão bem estabelecidos. Nosso objetivo foi avaliar aspectos morfofisiológicos da linhagem celular Caco-2 frente às infecções por *T. gondii*. Foram avaliados os efeitos na endocitose e permeabilidade paracelular por meio do dextran em células infectadas, a integridade e a distribuição das microvilosidades (utilizando faloidina para detecção de actina), a formação da junção de oclusão (através da localização celular da ocludina), a mensuração da resistência elétrica transepitelial (TEER), e a expressão de citocinas IL-1 $\beta$  e IL-8. A inibição da via de sinalização Notch também foi avaliada nas células Caco-2 frente ao parasito. Nossos resultados demonstraram que a endocitose de dextran foi menor nas células infectadas. Devido à infecção pôde ser claramente observada a perda das microvilosidades, quando comparada com células não infectadas. Quanto à distribuição da ocludina, foi observado um padrão de distribuição tipo rede de forma íntegra nas células não infectadas. Por outro lado, as células infectadas com *T. gondii* mostraram que a ocludina está localizada de forma descontínua na membrana apical. Consequentemente pode-se observar uma diminuição da TEER devido alteração da junção de oclusão nas células infectadas. Sobre a expressão de RNAs mensageiros, observou-se um aumento da citocina IL-8 e uma tendência de aumento de IL-1 $\beta$  na presença de *T. gondii*. A inibição da via Notch nas células Caco-2 afetou a proliferação do parasito. Estes resultados sugerem a influência da invasão de *T. gondii* na homeostase intestinal, incluindo alterações na permeabilidade e de distribuição da ocludina e actina. Em estudos posteriores, a inclusão de sistemas *in vivo* poderá ampliar e reforçar esses resultados.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, Caco-2, ocludina, dextran, actina, polaridade.

## Abstract

*Toxoplasma gondii*, a zoonotic Apicomplexa phylum parasite, is an obligate intracellular pathogen responsible for 10-50% of human infections worldwide. Cell invasion is essential for parasite surviving. Thus, it is expected that both parasite and host cell compounds help *T. gondii* succeed invasion at intestinal environment. Moreover, the mechanisms by which the parasite invades and disseminates through the gastrointestinal tract are not well established. We aimed to evaluate and determine some morphophysiological modifications on the cell line Caco-2 during *T. gondii* infection. To accomplish this, we addressed to assess the effect on dextran endocytosis and paracellular permeability of infected cells, investigate the effect of *T. gondii* on Caco-2 microvilli (using phalloidin for actin detection) and tight junction integrity (by occludin detection) on this cell line. To establish whether *T. gondii* infection can modify the transepithelial electrical resistance (TEER), and IL-1 $\beta$  and IL-8 cytokines expression. Moreover, we took further to study the influence of Notch pathway in Caco-2 cells infected with this parasite. Our results show that dextran endocytosis is less in infected cells than in non-infected cells. Caco-2 brush border was disrupted due *T. gondii* infection showing a dissipation of microvilli at the cell surface. The infection outcome could be clearly observed by loss of microvilli when comparing non-infected cells. For evaluated the effect of *T. gondii* infection on occludin distribution, we performed immunofluorescences. Occludin was observed in a net pattern on control cells, however this pattern is not well established in the presence of the parasite. In addition, the protein localization was clearly lower at infected cells, compared to non-infected ones. TEER in Caco-2 cells infected decreased than in non-infected control. There was an increase in IL-8 and an increasing tendency in IL-1 $\beta$  mRNAs expression when Caco-2 cells were infected. Furthermore, intracellular proliferation of *T. gondii* diminishes in the presence of Notch pathway inhibitor. These results suggest the important influence of *T. gondii* invasion on the homeostasis of intestinal cells including tight junction and brush border integrity and, cell permeability leading loss of epithelia polarity. Nevertheless, further investigation using animal model is needed to better understand the effect of *T. gondii* infection on polarity and cell surface.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, Caco-2, occludin, dextran, actin, polarity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Via de sinalização Notch.....	19
FIGURA 2 – Imagem representativa do sistema <i>Transwell</i> , indicando os compartimentos.....	27
TABELA 1 - Sequência de Primers.....	30
FIGURA 3 – Diminuição de viabilidade celular das células Caco-2 infectadas com taquizoítos de <i>T. gondii</i> .....	32
FIGURA 4 – Maior endocitose de FITC-Dextran pelas células Caco-2 não infectadas em comparação com as células infectadas com <i>T. gondii</i> .....	33
FIGURA 5 – <i>T. gondii</i> aumenta a permeabilidade paracelular de FITC-Dextran nas células Caco-2.....	34
FIGURA 6A-B – Alteração do citoesqueleto de actina de células Caco-2 na infecção por <i>T. gondii</i> .....	35-36
FIGURA 7A-B – A infecção por <i>T. gondii</i> induz uma diminuição de ocludina nas células Caco-2.....	37
FIGURA 8 – A Resistência Elétrica Transepitelial das células Caco-2 diminui na infecção por <i>T. gondii</i> .....	38
FIGURA 9 – Viabilidade de células Caco-2 tratadas com o inibidor de proteína $\gamma$ -secretase da via Notch.....	39
FIGURA 10 – Diminuição do índice de proliferação dos taquizoítos de <i>T. gondii</i> nas células Caco-2 na presença do inibidor de $\gamma$ -secretase.....	40
FIGURA 11 – A expressão de citocinas inflamatórias aumenta nas células Caco-2 infectadas com <i>T. gondii</i> .....	41



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**%** - Porcentagem

**$\beta$ -actina** – beta-actina

**$\mu$ g** - Microgramas

**$\mu$ l** – Microlitros

**$\mu$ m** - Micrômetro

**$\mu$ M** – Micromolar

**mM** – Milimolar

**mg** - Miligramas

**ng** - Nanogramas

**BCRJ** – Banco de células do Rio de Janeiro

**BSA** – Albumina de soro bovino

**Caco-2** – Células de adenocarcino de cólon humano

**cDNA** - Ácido desoxirribonucleico complementar

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono

**CPRG** - Clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

**DBZ** - Dibenzazepina

**DMEM** - Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMSO** - Dimetilsulfoxido

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**DSL** – Ligantes transmembrana Delta e Jagged

**ELISA** – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

**FITC** - Isotiocianato de fluoresceína

**GAPDH** - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

**GSI** – Inibidores de gama secretase

**GTPases** - Guanosina-trifosfatases

**HeLa** – Células de carcinoma de cérvix humana

**IFN- $\gamma$**  – Interferon-gama

**IgG** – Imunoglobulina G

**IL-1 $\beta$**  – Interleucina-1-beta

**IL-8** – Interleucina 8

**kDa** – Kilodalton

**mRNA** – Ácido ribonucleico mensageiro

**MTT** - Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

**NICD** – Domínio intracelular Notch

**PBS** – Solução salina tamponada com fosfatos

**qPCR** - Reação em cadeia da polimerase quantitativa

**rIFN- $\gamma$**  – Interferon gama recombinante

**RPMI** - Roswell Park Memorial Institute Medium

**SBF** - Soro fetal bovino

**SDS** - Dodecil sulfato de sódio

**TACE** – Enzima conversora de TNF- $\alpha$

**TEER** – Resistencia Elétrica Transepitelial

**TGF-  $\beta$**  – Fator transformador de crescimento tipo beta

**TLR** - Receptor do tipo Toll

**TNF -  $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

## SUMARIO

<b>1.</b>	<b>Introdução</b>	13
1.1	<i>Toxoplasma gondii</i>	13
1.2	Transmissão e Ciclo Biológico de <i>T. gondii</i>	13
1.3	Aspectos Epidemiológicos da Toxoplasmose	15
1.4	Adesão e invasão de <i>T. gondii</i> a célula hospedeira	16
1.5	Proteínas de união célula-célula no Epitélio Intestinal	17
1.6	Via de sinalização Notch e desenvolvimento intestinal	18
1.7	Resposta imune intestinal na infecção por <i>T. gondii</i>	21
<b>2.</b>	<b>Objetivos</b>	22
2.1	Objetivo geral	22
2.2	Objetivos específicos	22
<b>3.</b>	<b>Justificativa</b>	23
<b>4.</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	23
4.1	Manutenção da linhagem celular Caco-2	23
4.2	Manutenção <i>in vitro</i> da cepa 2F1 de <i>T. gondii</i>	24
4.3	Infecção das células Caco-2	24
4.4	Avaliação da cinética da endocitose de FITC-Dextran (4 kDa) nas células Caco-2 na presença e ausência de <i>T. gondii</i>	25
4.5	Imunofluorescência para detecção de ocludina e actina em células Caco-2 infectadas com <i>T. gondii</i>	26
4.6	Ensaio de Permeabilidade paracelular nas células Caco-2	26
4.7	Ensaio de medição da Resistência Elétrica Transepitelial (TEER) das células Caco-2	27
4.8	Tratamento de células Caco-2 com inibidor para $\gamma$ -secretase (Dibenzazepina)	28
4.9	Ensaio de proliferação de <i>T. gondii</i> (cepa 2F1)	28
4.10	Ensaio colorimétrico de Viabilidade celular mediante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) de acordo com Mosmann (1983)	28
4.11	Avaliação da expressão de RNA mensageiro para IL-8 e IL-1 $\beta$	29
4.11.1	Extração de RNA mensageiro e obtenção do DNA complementar	29
4.11.2	Quantificação das mensagens de IL-8 e IL-1 $\beta$ por reação de PCR quantitativa (qPCR)	30
4.12	Análise estatística	31
<b>5.</b>	<b>Resultados</b>	32

5.1	Diminuição da viabilidade celular das células Caco-2 infectadas com taquízoítos de <i>T. gondii</i> .....	32
5.2	A endocitose do FITC-Dextran pelas células Caco-2 diminui na presença de <i>T. gondii</i> .....	32
5.3	A integridade da barreira epitelial das células Caco-2 foi alterada pela infecção com <i>T. gondii</i> .....	33
5.4	Alteração do citoesqueleto de actina de células Caco-2 na infecção por <i>T. gondii</i> ...	34
5.5	A infecção por <i>T. gondii</i> induz uma diminuição de ocludina nas células Caco-2 .....	37
5.6	A Resistência Elétrica Transepitelial das células Caco-2 diminui na infecção por <i>T. gondii</i> .....	38
5.7	Repercussão na viabilidade das células Caco-2 na presença do inibidor de $\gamma$ -secretase .....	38
5.8	Diminuição do índice de proliferação dos taquízoítos de <i>T. gondii</i> nas células Caco-2 na presença do inibidor de $\gamma$ -secretase .....	39
5.9	A expressão de citocinas inflamatórias aumenta nas células Caco-2 infectadas com <i>T. gondii</i> .....	40
<b>6.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>42</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusões</b> .....	<b>48</b>
	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>49</b>

## 1. Introdução

### 1.1 *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii*, protozoário do filo Apicomplexa, é um parasito intracelular obrigatório e de distribuição ubiquitária, sendo responsável por 10 – 50% de infecções humanas em todo mundo (MILLER et al., 2009; EGAN et al., 2012). Neste aspecto, uma das características mais importantes deste protozoário é sua habilidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros, incluindo aves, reptéis e mamíferos (WEBSTER, 2010; PAREDES-SANTOS et al., 2013). Entretanto, apenas os felídeos são os hospedeiros definitivos deste parasito, sendo os únicos que eliminam uma das formas infecciosas que são os oocistos junto com as fezes. Durante a infecção felina aguda, um gato pode excretar vários milhões de oocistos por dia (DUBEY; MILLER; FRENKEL, 1970; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; MONTOYA; ROSSO, 2005).

O ciclo biológico de *T. gondii* inclui três formas infecciosas: taquizoítos, com reprodução assexuada; bradizoítos, que formam cistos teciduais e também apresentam reprodução assexuada e esporozoítos, contidos dentro dos oocistos (DUBEY et al., 1998). A rápida divisão dos taquizoítos pode ser responsável pelos sinais clínicos da toxoplasmose, favorecendo a disseminação do parasito a quase todos os órgãos e tecidos do hospedeiro (POSSENTI et al., 2013). Os bradizoítos permanecem dentro de cistos intracelulares, protegidos dos mecanismos de defesa do sistema imune, sendo os principais componentes da fase crônica da toxoplasmose (WEISS; KIM, 2011). Os oocistos, outra forma resistente de *T. gondii*, são altamente infecciosos quando esporulados e podem permanecer viáveis por vários anos contaminando o ambiente (MITTAL; ICHHPUJANI, 2011).

Seus aspectos ubiquitário, infecciosos, epidemiológicos, patológicos e de resposta imune do hospedeiro, caracterizam um parasito peculiar e muito importante em termos de saúde pública mundial.

### 1.2 Transmissão e Ciclo Biológico de *T. gondii*

O principal mecanismo de transmissão de *T. gondii* ocorre mediante a ingestão de bradizoítos encistados em tecidos de hospedeiros cronicamente infectados ou esporozoítos contidos dentro dos oocistos esporulados (ALVARADO-ESQUIVEL; CAMPILLO-RUIZ; LIESENFELD, 2013). A partir deste ponto, segue-se um complexo ciclo biológico, englobando tanto reprodução sexuada, que ocorre nas células do epitélio intestinal dos

felídeos (gêneros *Felix* e *Lynx*), quanto assexuada, que ocorre nos tecidos dos hospedeiros intermediários (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

O estágio sexuado inicia-se quando os felídeos ingerem uma das três formas infectantes: taquizoítos, oocistos presentes no meio ambiente ou ainda cistos contendo bradizoítos. Diversas enzimas proteolíticas do estômago e do intestino delgado destroem a parede do oocisto ou cisto, liberando as formas infectantes. Estas invadem os enterócitos, onde passam por um processo de conversão para taquizoítos e apresentam uma intensa multiplicação por endodiogenia e merogonia. Este processo resulta na formação dos merozoítos e, posteriormente de esquizontes (DUBEY, 1998).

Em seguida, ocorre a formação dos gametas masculinos e femininos mediante o processo da gametogênese dentro da célula. Com a fertilização, os oocistos formados são liberados pelo rompimento dos enterócitos e excretados como formas não esporuladas nas fezes dos felídeos. O processo de esporulação ocorre alguns dias após liberação no meio externo, levando em conta condições favoráveis de temperatura, oxigenação e umidade. Em um período de um a cinco dias, os oocistos passam a ter dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada e se tornam infectantes no meio ambiente (DUBEY; FRENKEL, 1972). A excreção dos oocistos pelos felídeos começa de três a sete dias após a ingestão dos cistos teciduais e pode se prolongar por mais de 20 dias. Os oocistos podem infectar uma grande variedade de hospedeiros intermediários quando estes ingerem água ou alimentos contaminados. Nesta fase do ciclo, os felídeos também são susceptíveis, porém com uma baixa eficiência infecciosa (JONES; DUBEY, 2010).

Quando um hospedeiro intermediário ingere oocistos, os esporozoítos são liberados, penetram o epitélio intestinal, onde se diferenciam em taquizoítos. Estes, por sua vez, replicando-se rapidamente por endodiogenia dentro de qualquer célula e se disseminam facilmente por todo o organismo. Como resultado da conversão de taquizoíto a bradizoítos, os cistos teciduais se formam entre sete a dez dias após a infecção, e podem permanecer no hospedeiro intermediário indefinidamente, predominando no cérebro, olhos e músculos (MONTROYA; ROSSO, 2005).

A ingestão dos cistos teciduais por outro hospedeiro intermediário se dá por intermédio do consumo de carne crua ou mal cozida. A partir disto, a parede dos cistos se rompe quando passa pelo trato digestivo, causando a liberação de bradizoítos. Estes irão infectar o epitélio intestinal do novo hospedeiro, e assim se diferenciaram em taquizoíto disseminando-se por todo organismo (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012; TURNER et al., 2013).

### 1.3 Aspectos Epidemiológicos da Toxoplasmose

*T. gondii* é um parasito de ampla distribuição geográfica, abrangendo uma grande diversidade de hospedeiros. Isso também se reflete em termos de genótipos. Neste caso, a distribuição de diferentes genótipos apresenta um evidente padrão geográfico no que se refere às distintas cepas de parasitos encontrados nos hemisférios Norte e Sul. Assim, vem sendo extensamente relatado que as cepas da América do Sul são originadas de recombinações frequentes, sendo, portanto, mais diversificadas em relação à América do Norte e Europa. Nestas regiões, as cepas são agrupadas em três linhagens clonais, ou seja, com baixa heterogeneidade genética, designadas em tipo I, II, III (SIBLEY et al., 2009; SU et al., 2012). Entretanto, cepas clonais podem se expandir para regiões da América do Sul resultando na presença de novas linhagens com elevado potencial patogênico (SIBLEY; AJIOKA, 2008).

Independente da cepa, o hospedeiro humano pode se infectar com *T. gondii* pela ingestão ou manipulação de carne crua ou mal cozida. Normalmente a carne suína apresenta um alto índice de contaminação com cistos teciduais, constituindo uma importante fonte de infecção. Água e vegetais também podem ser importantes fontes de contaminação pela presença de oocistos excretados por gatos infectados (JONES; DUBEY, 2010; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

Neste aspecto, um estudo realizado no México demonstrou elevada circulação de *T. gondii* em porcos de fazendas; aproximadamente 50% dos animais estudados apresentou um estado de infecção crônica sugerindo uma constante exposição do homem ao parasito. Dentro deste contexto, a fonte de reinfecção de animais, que são criados para o consumo humano, pode ser causada pelo contínuo contato com oocistos de *T. gondii* presentes em fazendas, tanto em fontes de água, como no solo, os quais são encontrados frequentemente em sistemas de produção suína (ORTEGA-PACHECO et al., 2013).

Fatores climáticos também podem afetar a viabilidade do oocisto no meio ambiente. Em países tropicais existe uma elevada prevalência de toxoplasmose devido ao clima quente e úmido, o que favorece a sobrevivência prolongada do oocisto. Além dos fatores ambientais, fatores antropomórficos também são relevantes para se entender aspectos epidemiológicos da toxoplasmose. Neste caso, hábitos humanos podem explicar porque existe uma grande variação na soroprevalência da doença no homem, em relação aos hábitos diários: cozimento dos alimentos, hábitos higiênicos, tipos de alimentos consumidos e a higienização dos mesmos. Também incluem os hábitos culturais, sociais e econômicos e interferência em ambientes silvestres, cujo resultado é o contato do hospedeiro com cepas até então

desconhecidas (CARME et al., 2009; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). A este fator, deve ser ressaltada a ampla gama de hospedeiros intermediários de *T. gondii* incluindo hospedeiros silvestres, cujo contato com o homem pode resultar em casos de toxoplasmose (CARME et al., 2009).

Os aspectos socioeconômicos podem se relacionar com uma elevada frequência da infecção por *T. gondii*. Assim, Bahia-Oliveira e colaboradores (2003) constataram que, na cidade de Campos dos Goytacazes, norte do estado do Rio de Janeiro – Brasil, 84% da população de baixo nível socioeconômico apresentou anticorpos IgG anti- *T. gondii*, em comparação com 23% da população soropositivos de elevado nível socioeconômico.

Dubey e colaboradores (2012) acreditam que o Brasil, com uma alta prevalência de infecção por *T. gondii* em animais e humanos, seja um espaço de investigação para grupos internacionais pesquisarem a epidemiologia e controle da toxoplasmose. Como foco importante, são necessárias medidas preventivas, tais como higiene, possível imunização com a descoberta de uma vacina para a toxoplasmose e educação sanitária, que deveriam começar nas escolas do ensino fundamental, sabendo-se que 50% das crianças de 10 anos, em várias localidades do Brasil, estão expostas a *T. gondii*.

#### 1.4 Adesão e invasão de *T. gondii* a célula hospedeira

Em detrimento a muitos outros microrganismos intracelulares, *T. gondii* apresenta uma via de invasão dinâmica e ativa. Para invadir as células alvo, o parasito depende de seu movimento e da secreção contínua de proteínas contidas em organelas secretórias, tais como micronemas, roptrias e grânulos densos (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

A primeira etapa deste processo é a adesão do parasito à membrana da célula, por intermédio de receptores de tipo integrinas, laminina e colágeno tipo IV (FURTADO et al., 1992; BISHOP; CRAWFORD; ESKO, 2005). Além disso, o parasito utiliza adesinas dependente de cálcio, as quais são secretadas pelas micronemas, as quais promovem a orientação e a adesão do mesmo (HUYNH; CARRUTHERS, 2006).

A etapa que se segue a adesão é a invasão do parasito. Análises por microscopia eletrônica demonstram que as organelas utilizadas por *T. gondii* para armazenar e secretar as proteínas necessárias para invasão das células hospedeiras se encontram em elevada quantidade na zona apical. Nesta região, se localizam dois dos compartimentos mais importantes para esta finalidade, as micronemas e roptrias (LEMGRUBER et al., 2011).

As micronemas, as roptrias e os grânulos densos, são secretados de um modo organizado, como uma série de eventos contínuos durante a invasão de uma célula.



Primeiramente, o conteúdo das micronemas, localizados na zona apical do parasito, é descarregado durante o contato inicial com a superfície da célula. Em seguida, um grupo de aproximadamente 10 roptrias libera seu conteúdo proteico no citoplasma da célula, onde o parasito é invaginado pela membrana da célula hospedeira, formando o vacúolo parasitóforo. Este vacúolo o protege dos mecanismos de defesa da célula e da fusão dos compartimentos lisossômicos. Além disso, a secreção de grânulos densos é regulada para liberar proteínas no lúmen do vacúolo parasitóforo (NICHOLS; CHIAPPINO; O'CONNOR, 1983; CARRUTHERS, 2002; CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007).

De acordo com estudos bioquímicos e genéticos, existem três funções das organelas mencionadas: 1) modificação do vacúolo parasitóforo para a aquisição de nutrientes obtidos pela célula hospedeira; 2) proteínas das roptrias ajudam na biogênese e associação das organelas do hospedeiro com o vacúolo parasitóforo; e 3) a adesão e penetração do parasito na célula alvo desempenhada pelas proteínas das micronemas (CARRUTHERS, 2002).

Neste processo de adesão e invasão, o intestino delgado representa um lugar fundamental para o parasito de continuidade ao ciclo biológico. A compreensão dos aspectos morfológicos e fisiológicos do epitélio intestinal, bem como da via de sinalização Notch (na homeostase e desenvolvimento intestinal) é crucial para se compreender a dinâmica de infecção de *T. gondii*.

### 1.5 Proteínas de união célula-célula no Epitélio Intestinal

O intestino tem um propósito essencial e crítico em todos os seres vivos: a absorção de nutrientes. Para que este propósito seja alcançado de modo adequado, o intestino deve funcionar como uma barreira seletiva, digerindo e absorvendo nutrientes, e simultaneamente bloqueando o ingresso de microrganismos e toxinas no organismo (MCGUCKIN et al., 2011; TAKASHIMA; GOLD; HARTENSTEIN, 2013).

As células epiteliais formam parte das barreiras superficiais que separam os diferentes ambientes do hospedeiro e o ambiente externo. O trato gastrointestinal é a barreira com maior comprimento e está adaptada especificamente para a colonização de bactérias comensais. Estas ajudam na digestão e influenciam no desenvolvimento e função do sistema imune no nível da mucosa intestinal (PETERSON; ARTIS, 2014).

A camada simples de células epiteliais formando o trato gastrointestinal atua como uma barreira seletiva dividindo o ambiente luminal e os tecidos subepiteliais e está constituída por diferentes tipos de células, as quais entram rápida e continuamente em um processo de renovação pelas células tronco intestinais residentes na base das criptas de Lieberkuhn

(NOAH; SHROYER, 2013). O espaço entre as células epiteliais precisa ser vedado; essa função é feita pelos complexos apicais de união, que inclui as junções de oclusão e aderentes. Esse conjunto proteico define a polaridade das células epiteliais e regula o transporte passivo paracelular de íons, nutrientes, e células imunes através do epitélio gastrointestinal (LAPOINTE; BURET, 2011; SHEN, 2012).

Os grupos de junções de oclusão e aderente têm como suporte um denso anel de actina e miosina que podem regular a função de barreira (TURNER, 2009). A perda das junções aderentes leva à dissociação das proteínas de união célula-célula e de união matriz-célula, perda da diferenciação e polarização da célula epitelial promovendo a apoptose prematura (HERMISTON; GORDON, 1995). As junções aderentes são necessárias para a constituição das junções de oclusão, as quais vedam o espaço paracelular. As junções de oclusão são complexos multiproteicos, que ficam na porção intercelular apical, compostos de proteínas transmembrana, proteínas periféricas de membrana (zônula occludens) e moléculas reguladoras como as quinases (SCHNEEBERGER; LYNCH, 2004; TURNER, 2009; LIMA, et al. 2010).

As proteínas transmembrana mais importantes das junções de oclusão são os membros da família das ocludina e das claudina; essas últimas podem definir aspectos importantes da permeabilidade das junções de oclusão. A ocludina interage diretamente com as proteínas claudina e actina. Estudos recentes indicam que a expressão reduzida *knockdown* do gene que expressa a proteína ocludina, induz o aumento da permeabilidade paracelular de macromoléculas; o que aponta que a ocludina tem um papel importante na manutenção e estrutura das junções de oclusão (TURNER, 2009; AL-SADI et al., 2011).

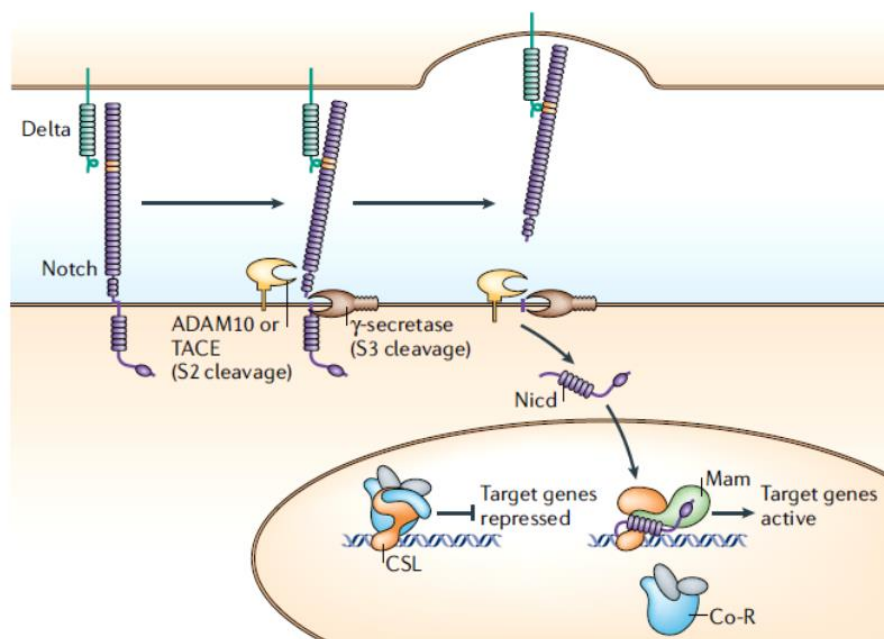
As junções de oclusão são consideradas estruturas chave que regulam o tráfego paracelular de macromoléculas, ou seja, na seletividade dos solutos por tamanho e carga. O rompimento da barreira das junções de oclusão intestinais pode levar ao aumento da permeabilidade paracelular, seguido da permeação de moléculas pro-inflamatórias que chegam do meio externo. Tudo isto induz a ativação do sistema imune da mucosa, promovendo a inflamação e o dano tecidual (LEE, 2015).

#### 1.6 Via de sinalização Notch e desenvolvimento intestinal

A via de sinalização Notch é um sistema de sinalização conhecida por regular o desenvolvimento embrionário e morfogêneses nos metazoários (KOPAN, 2012). A via Notch representa um tipo de comunicação direta célula-célula essencial para regular a proliferação, apoptose e para definir o destino das células progenitoras ou células tronco durante o

desenvolvimento dos diferentes tecidos do organismo (GRIDLEY, 2007). Alguns estudos demonstram que esta via de sinalização é responsável pela regulação do destino das células mesenquimatosas em células progenitoras de intestino de mamíferos e *Drosophila melanogaster* (ARTAVANIS-TSAKONAS; RAND; LAKE, 1999; VAN ES et al., 2005).

Notch (Notch 1-4) é um receptor de superfície celular que transmite sinais mediante a interação com ligantes transmembrana (DSL) como Delta e Jagged (em mamíferos) em células vizinhas.



**Figura 1 - Via de sinalização Notch.** A união do ligante Delta (verde) de uma célula ao receptor Notch (roxo) de outra célula tem como resposta a clivagem proteolítica do receptor. A metaloproteinase ADAM10 (TACE-Enzima conversora de TNF- $\alpha$ ) e o complexo  $\gamma$ -secretase catalisam a reação para liberar o domínio intracelular Notch (NICD), que entra ao núcleo e interage com as proteínas de união a DNA (CSL) e o coativador Mastermind (Mam). Fonte: BRAY; 2006.

Em mamíferos, foram identificados três genes tipo Delta (Dll), designados Dll-1, - 3 e -4. Para os ligantes de tipo Serrate, existem dois genes: Serrate1/Jagged-1 e Serrate2/Jagged-2, os quais foram isolados de humanos, ratos e camundongos (MIYAMOTO; WEINMASTER, 2008; KOPAN, 2012).

A união do receptor com seu respectivo ligante implicam duas rupturas proteolíticas no receptor Notch. A primeira ruptura é catalisada por uma metaloproteinase ADAM10; e a segunda ruptura é mediante uma  $\gamma$ -secretase, um complexo enzimático que contém várias outras proteínas como presenilina, nicastrina, PEN2 e APH1. Esta segunda ruptura libera o domínio intracelular Notch (NICD), sendo transportada ao núcleo para ligar-se com uma

proteína de união ao DNA, chamada CSL, representado por CBF-1/RBP-J $\kappa$  em mamíferos, Su(H) em *Drosophila*, e Lag-1 em *Caenorhabditis elegans*; e um coativador Mastermind (Mam) para promover a transcrição de genes alvos (BRAY, 2006).

No cólon, existe uma abundante expressão de Notch 1 e Jagged 1 nas zonas proliferativas das criptas, sendo que Jagged 2 apresenta uma expressão uniforme em quase toda a cripta (MIYAMOTO; ROSENBERG, 2011). Dessa forma, aparentemente a via de sinalização Notch apresenta relevância na homeostase e desenvolvimento intestinal.

Um dos papéis essenciais da via de sinalização Notch no intestino é controlar a diferenciação das células mesenquimatosas intestinais. Este papel foi identificado mediante estudos utilizando inibidores de  $\gamma$ -secretase (GSIs) em roedores causando um aumento da produção de células caliciformes e enteroendócrinas (MILANO et al., 2004).

A via Notch está ativa nas células mesenquimatosas intestinais e nas criptas progenitoras (FRE et al., 2011). Exemplos da presença dos diferentes protagonistas da via de sinalização Notch são os ligantes Dll1 e Dll4, que estão expressos nas células secretórias intestinais. Além disso, existe uma expressão significativa de ligantes transmembrana DSL nas células de Paneth e nas células caliciformes na base da cripta as quais atuam como células de suporte para as células mesenquimatosas no intestino e colón, respectivamente (SATO et al., 2011).

O papel da via de sinalização Notch no controle da diferenciação e proliferação das células intestinais foi confirmado pela utilização de camundongos transgênicos. A deleção de Hes-1, que é o gene alvo mais importante da via Notch, foi associado com um aumento significativo de células epiteliais intestinais de tipo secretórias. Outro ensaio fazendo a inativação específica de CSL, proteína de união ao DNA, teve como resultado a completa perda da proliferação de células progenitoras nas criptas, de modo que elas continuaram o processo de diferenciação em células caliciformes (VAN ES et al., 2005; MIYAMOTO; ROSENBERG, 2011).

Por outro lado, os níveis de expressão da via Notch tem que ser adequados para um ótimo desenvolvimento das células mesenquimais gastrointestinais. Kim e colaboradores (2011), identificaram defeitos graves no desenvolvimento de fibroblastos subepiteliais e uma diminuição do comprimento do intestino em camundongos com uma deleção do gene RBP-J $\kappa$ . Além disso, a atividade constitutiva de Notch também produz uma rápida perda de células mesenquimatosas e da organogênese. Isto sugere que é necessária uma atividade balanceada da via Notch para ter uma organização apropriada das células intestinais.

A terceira função da via de sinalização Notch no intestino é manter a homeostase das células mesenquimatosas epiteliais. Vandussen e colaboradores (2012) mostram que mediante o bloqueio da via Notch com dibenzazepina acontece uma perda das células mesenquimatosas colunares que ficam na base das criptas. Eles esclarecem que a inibição de Notch estimula uma diferenciação precoce das células progenitoras em células de tipo secretórias, como as células caliciformes, endócrinas, com borda em escova e células com uma co-expressão de marcadores celulares de tipo caliciforme e Paneth representado por Muc2 e, lisozima e Mmp7, respectivamente (PELLEGRINET et al., 2011).

### 1.7 Resposta imune intestinal na infecção por *T. gondii*

Quando o hospedeiro tem contato com *T. gondii* via oral, o primeiro encontro do sistema imune do hospedeiro com o parasito é na mucosa intestinal. O sistema imune da mucosa é composto por uma camada de células epiteliais que separa a lâmina própria do lúmen intestinal (MOWAT, 2003). Neste epitélio, encontra-se uma população heterogenea de células T denominadas linfócitos intraepiteliais. Estes linfócitos contribuem com a homeostase e defesa do ambiente intestinal, mantendo a integridade da barreira epitelial. A lâmina própria está composta por miofibroblastos, células T, células B, macrófagos e células dendríticas. Além dessas células, as placas de Peyer desempenham um importante papel de proteção. Essas placas são agregados de nódulos linfoides que formam parte do tecido linfoide associado às mucosas, e ajudam no transporte de antígenos e patógenos sendo considerados sensores imunes do intestino (JUNG; HUGOT; BARREAU, 2010; CHEROUTRE; LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011).

Após a ingestão dos oocistos ou cistos contendo bradizoítos, a parede do oocisto ou cisto é digerida no estomago; os esporozoítos ou bradizoítos atravessam o epitélio do intestino delgado e penetram na lamina própria, onde estes se diferenciam em taquizoítos em aproximadamente 24 horas (DUBEY, 2008).

Entre 24 a 48 horas, os parasitos disseminam para os sítios extraintestinais onde macrófagos e células dendríticas infectadas pelos parasitos podem ser mediadores dessa disseminação (COURRET et al., 2006; BIERLY et al., 2008). Os macrófagos inflamatórios desempenham um importante papel microbicida nesta etapa de infecção; o recrutamento destas células depende da expressão de receptores de quimiocinas (CCR2), resultando na morte do parasito (DUNAY et al., 2008). Além disso, a destruição do vacúolo parasitóforo depende de enzimas do tipo GTPases, relacionadas com a imunidade dependentes de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (FENTRESS et al., 2010).

O início da resposta imune da mucosa intestinal engloba o reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) como profilina e glicosil fosfoinositol (EGAN et al., 2009). Em modelos murinos, a ativação de células dendríticas da mucosa mediante receptores do tipo Toll (TLRs: TLR11, TLR2 e TLR4) ocorre após a apresentação de antígeno e ativação de células T nos tecidos linfoides. Mas, na ausência de TLR11, a produção de IFN- $\gamma$  por células T tem um efeito mínimo (BENSON et al., 2009). Por isso, sugere-se que a translocação de bactérias tem um papel importante para iniciar uma resposta imune contra o parasito, atuando como um efeito adjuvante na ativação da resposta imune. Em camundongos, na ausência de flora intestinal, não ocorre produção de citocinas secretadas por células T após infecção com *T. gondii*; mas a administração oral de lipopolissacarídeos bacterianos, reverte este efeito (HEIMESAAT et al., 2006; BENSON et al., 2009).

A via de interação entre células T CD4<sup>+</sup> da lâmina própria, linfócitos intraepiteliais e enterócitos atua no sentido de manter a homeostase intestinal e promover a proteção durante a infecção por *T. gondii*. Entretanto, em camundongos infectados com o parasito, linfócitos intraepiteliais CD8 $\alpha\beta$  produzem IFN- $\gamma$ , desencadeando uma atividade citotóxica contra os enterócitos e macrófagos infectados (CHARDÈS et al., 1994).

As populações de linfócitos intraepiteliais também realizam atividades de tipo imunoreguladoras no intestino durante a infecção por *T. gondii*. As células T CD4<sup>+</sup> da lamina própria trabalham em conjunto com as células epiteliais do intestino para a produção de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias (MENNECHET et al., 2002). Uma importante função dos linfócitos intraepiteliais é modular a resposta pro-inflamatória para proteger o intestino do parasito. Isto ocorre pela produção do fator de crescimento transformante tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) pelos linfócitos intraepiteliais CD8 $\alpha\beta$ , que regulam negativamente a expressão de IFN- $\gamma$  pelas células T CD4<sup>+</sup> da lâmina própria (BUZONI-GATEL et al., 2001, MENNECHET et al., 2004).

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar aspectos morfológicos e fisiológicos da infecção de células de cólon humano da linhagem celular Caco-2 por *Toxoplasma gondii*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração ótima de dextran em células Caco-2 para avaliação de endocitose celular frente à infecção por *T. gondii*
- Avaliar a expressão da proteína de junção de oclusão, ocludina e da proteína actina em células Caco-2 infectadas por *T. gondii*.
- Quantificar a expressão de RNAs mensageiros de citocinas em células Caco-2 infectadas por *T. gondii*.
- Analisar a permeabilidade paracelular de células Caco-2 infectadas por *T. gondii*.
- Determinar a resistência elétrica transepitelial das células Caco-2 infectadas por *T. gondii*.
- Verificar o efeito do inibidor do complexo proteico  $\gamma$ -secretase (Dibenzazepina) na viabilidade das células Caco-2.
- Verificar o efeito do inibidor do complexo proteico  $\gamma$ -secretase (Dibenzazepina) na proliferação intracelular de *T. gondii*.

### 3. Justificativa

Os aspectos epidemiológicos da toxoplasmose e a elevada patogenicidade dependendo do tipo de cepa de *T. gondii*, leva a considerar a importância de conhecer como o parasito atua sobre a arquitetura do epitélio intestinal. Sabendo que a via natural de infecção por *T. gondii* é a entrada através do intestino, consideramos que é relevante o estudo das diferentes proteínas que auxiliam no suporte do epitélio intestinal, tais como ocludina e actina. Sendo uma importante barreira á entrada de patógenos seria interessante avaliar se a permeabilidade seria alterada pela infecção pelo parasito. Além disso, devido ao importante papel de Notch na diferenciação de células epiteliais intestinais decidimos avaliar a proliferação do parasito em células intestinais Caco-2 quando ocorre a inibição da via Notch.

### 4. Materiais e Métodos

#### 4.1 Manutenção da linhagem celular Caco-2

A linhagem celular Caco-2 (BCRJ:CR059 – Banco de Células do Rio de Janeiro), proveniente do adenocarcinoma de cólon humano, foi cultivada em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> no laboratório de Imunopatologia – Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) – Universidade Federal de Uberlândia (UFU), utilizando o meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) (Cultilab, Campinas,SP, Brasil) suplementado com 20% de soro fetal

bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 1% de L-glutamina (2mM) e 1% de antibiótico (10.000U/ml de penicilina, e 100mg/ml de estreptomicina) (Sigma Chemical Co., St Louis, USA).

O repique das células foi realizado a cada cinco dias, sempre procedendo ao crescimento das células conforme descrito a seguir: retirou-se o meio de cultura e adicionou-se meio de cultura incompleto (meio DMEM sem suplementos) para retirar o excedente de SFB da garrafa de cultura. Em seguida, adicionou-se 1,0 ml de solução tripsina (0,25%) e EDTA(0.53mM). Posteriormente, a garrafa foi incubada na estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> entre 10-15 minutos.

As células liberadas foram retiradas e transferidas para um tubo de 15 ml e centrifugadas a temperatura ambiente, por 5 minutos a 151 x g. O precipitado de células foi ressuspenso em 1,0 ml de meio de cultura com os suplementos mencionados, distribuído em duas garrafas de cultivo novas contendo 5,0 ml de meio completo e mantidas na estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células também foram congeladas em meio de congelamento (90% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfoxido-DMSO).

A fim de se obter diferenciação morfológica de tipo enterócito, no nível da presença de microvilosidades, polaridade celular e presença de junções de oclusão as células foram mantidas por 20 dias em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> trocando o meio cada dois dias (PINTO et al., 1983).

#### 4.2 Manutenção *in vitro* da cepa 2F1 de *T. gondii*

Foi utilizada a cepa 2F1 de *T. gondii*, derivada da cepa RH, tendo a característica de expressar o gene da enzima  $\beta$ -galactosidase, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Vern Carruther da Universidade de Michigan – Escola de Medicina (USA). A cepa 2F1 foi mantida na linhagem de células de carcinoma de cérvix humana (HeLa), obtidas da ATCC, cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab - Brasil) a 2% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab - Brasil). À medida que as células infectadas foram sendo lizadas pelo parasito, o meio contendo taquizoítos livres foi centrifugado a 400 x g por 5 minutos e o precipitado ressuspenso em meio a 2%. Em seguida, os parasitos foram distribuídos em novos frascos contendo células HeLa confluentes.

#### 4.3 Infecção das células Caco-2

As células Caco-2 cultivadas em meio DMEM 20% foram mantidas em placas (Tissue Culture Testplate – TPP - Suíça) de 24 poços (densidade de  $5,0 \times 10^5$  células/300 $\mu$ l/poço) com



ou sem lamínulas de vidro (13 mm de diâmetro); ou placas de 96 poços (densidade de  $7,0 \times 10^4$  células/100µl/poço) dependendo do experimento a realizar, e mantidas na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A concentração de soro fetal bovino foi reduzida a 2% para a realização da infecção.

Para retirar as células HeLa da solução de parasitos que seriam utilizados para a infecção foi feita uma centrifugação diferencial. Primeiramente foi realizada uma centrifugação a 400 x g por 5 minutos; o sobrenadante foi coletado em outro tubo e centrifugado novamente por 5 minutos a 151 x g e foi obtido o precipitado com parasitos. A infecção foi feita com parasitos da cepa 2F1 de *T. gondii* na proporção de cinco parasitos por célula por poço, seguido de incubação por 3 horas a 37°C. Após esse período, as células foram lavadas com o meio incompleto para remoção dos parasitos que não infectaram e novamente incubadas por 24 horas a 37°C com meio completo, seguindo as condições anteriormente mencionadas.

#### 4.4 Avaliação da cinética da endocitose de FITC-Dextran (4 kDa) nas células Caco-2 na presença e ausência de *T. gondii*

As células Caco-2 foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas em uma quantidade de  $5,0 \times 10^5$  células/300µl/poço, mantidas em cultivo por 20 dias para ter uma plena polarização e diferenciação celular das mesmas. As células foram infectadas em uma proporção de cinco parasitos por célula, seguindo o procedimento mencionado anteriormente. Após as 24 horas de infecção, o meio foi trocado por meio incompleto e incubou-se por 30 minutos na estufa. Foram avaliadas duas concentrações de FITC-Dextran (Sigma) (0,5 e 1,0 mg/ml), para determinar qual seria a melhor concentração considerando a formação de vesículas contendo o carboidrato (dados não mostrados).

Um mg/ml de Dextran foi determinado como a concentração a ser utilizada para o experimento descrito a seguir. Após 30 minutos, as células foram incubadas com 1,0 mg/ml de Dextran diluído em meio DMEM incompleto. O tempo para avaliar a endocitose foi de 60 minutos.

Para fixar as células, as lamínulas foram lavadas com PBS fresco três vezes, fixadas com 4% de formalina [10% de formol e 0,3 % de glutaraldeído (25%) diluídos em PBS] por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Em seguida, as lamínulas foram novamente lavadas três vezes com PBS.

Para marcar o núcleo, foi utilizado o marcador ToPRO 3 (Invitrogen - T3605), em uma diluição de 1:2000 em PBS, incubado por 1 hora a temperatura ambiente no escuro.

Após o período de incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS fresco três vezes e fixadas novamente. As lamínulas foram montadas em lâminas com 10 µl de reagente de montagem de lamínulas SlowFade-Gold antifage (Life Technologies – S36936), colocadas em lamina e seladas com esmalte transparente. As lamínulas foram observadas no microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta.

#### 4.5 Imunofluorescência para detecção de ocludina e actina em células Caco-2 infectadas com *T. gondii*.

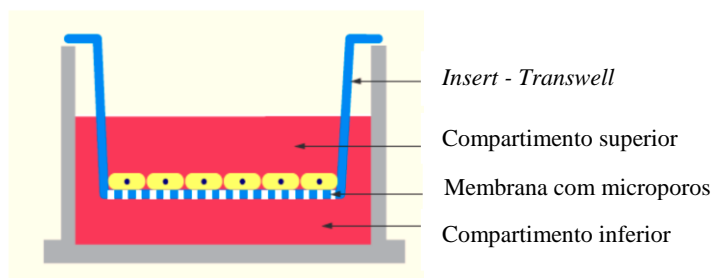
As células Caco-2 foram cultivadas em lamínulas em placas de 24 poços, numa concentração de  $5,0 \times 10^5$  células/300µl/poço; e foram mantidas em cultivo por 20 dias para se obter uma plena diferenciação celular das mesmas. As células foram infectadas numa proporção de cinco parasitos por célula, seguindo o procedimento mencionado anteriormente.

Após o tempo de infecção, as células foram fixadas com metanol gelado, e incubadas por 15 minutos a -20°C. Seguida da fixação, as lamínulas foram lavadas com PBS três vezes e permeabilizadas com saponina (0,05% em PBS) por 15 minutos a temperatura ambiente. O bloqueio de sítios não específicos foi feito com solução de bloqueio (2% BSA e 0,01% saponina diluídos em PBS) por 30 minutos a temperatura ambiente. Após o tempo, as lamínulas foram incubadas com os anticorpos primários: anticorpo de coelho anti-occludina (1:100) (Life Technologies - 711500) e anticorpo de camundongo IgG anti-SAG1 (1:300), ambos diluídos em solução de bloqueio e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as lamínulas foram lavadas seis vezes (5 minutos cada lavagem) com solução de bloqueio. Adicionou-se o anticorpo secundário correspondente para cada anticorpo primário, e incubou-se por 1 hora a temperatura ambiente no escuro. Junto com os anticorpos secundários, foi adicionado o reagente faloidina (1:300) conjugado com Alexa flúor 564 (Life Technologies – A22283). Em seguida, seis lavagens foram realizadas com PBS, sendo as células fixadas com metanol a -20°C por 5 minutos; procedeu-se uma nova lavagem com PBS e, por ultimo, as lamínulas foram montadas em lamina com 10µl de reagente de montagem de lamínulas SlowFade-Gold antifage (Life Technologies – S36936), colocadas para baixo e seladas com esmalte transparente. As lamínulas foram observadas no microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta.

#### 4.6 Ensaio de Permeabilidade paracelular nas células Caco-2

Para avaliar a permeabilidade paracelular da linhagem Caco-2, foram utilizadas placas com 12 *inserts* de membrana de policarbonato (tamanho do poro 0,4 µm - Transwells® 3460

– Clear - Costar); a uma densidade de  $5,0 \times 10^5$  células/300µl/membrana; no compartimento inferior, foram adicionados 1.000µl de meio, sendo mantidas por 20 dias na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de cultivo, o meio DMEM com SFB foi substituído por meio DMEM sem SFB e incubado por 30 minutos na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foi diluído o carboidrato FITC-Dextran em uma concentração final de 1,0 mg/ml em meio DMEM sem SFB, adicionado no compartimento superior e incubado por 1 hora na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, o meio foi coletado de ambos os compartimentos para mensuração a 483 nm de excitação e 525 nm de emissão no leitor de placas (Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), juntamente com uma curva padrão de Dextran (40 µg/ml a 0,625 µg/ml de Dextran diluído em meio DMEM sem SFB).



**Figura 2 - Imagem representativa do sistema Transwell, indicando os compartimentos deste.** As células são cultivadas no compartimento superior, sobre o *insert* que é a membrana de polycarbonato. No compartimento inferior é adicionado meio suficiente para cobrir o *insert*. Disponível em: <[http://csmmedia2.corning.com/LifeSciences/Media/pdf/transwell\\_guide.pdf](http://csmmedia2.corning.com/LifeSciences/Media/pdf/transwell_guide.pdf)>. Acesso em: 23 de fev. 2015.

#### 4.7 Ensaio de medição da Resistencia Elétrica Transepitelial (TEER) das células Caco-2

Para avaliar a resistência elétrica transepitelial (TEER) da linhagem Caco-2, foram utilizadas placas com 24 *inserts* de membrana de polycarbonato (área do *insert* 0,3 cm<sup>2</sup> - tamanho do poro 0,4 µm - Transwells® 353095 – Falcon); a uma densidade de  $3,0 \times 10^4$  células/300µl/membrana; no compartimento inferior, foram adicionados 600µl de meio, sendo mantidas por 20 dias na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os *inserts* foram divididos em três grupos: *inserts* com meio sem célula, *inserts* não infectados e *inserts* infectados. Após o tempo de cultivo, foi medido a TEER, duas vezes por *insert*, no aparelho EVON<sup>2</sup> voltohmeter. A infecção foi feita por 24 horas conforme descrito anteriormente. Após as 24 horas de infecção, os *inserts* foram medidos novamente no aparelho mencionado. Os dados são mostrados como ohms/cm<sup>2</sup>. Para determinar o valor real da resistência elétrica

transepitelial das células Caco-2 foi feito uma subtração da TEER das células que o aparelho mostra menos a TEER dos *inserts* com meio sem células.

#### 4.8 Tratamento de células Caco-2 com inibidor para $\gamma$ -secretase (Dibenzazepina)

As células foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços, onde se realizou o tratamento com o inibidor para a enzima  $\gamma$ -secretase, dibenzazepina (DBZ), utilizando duas concentrações (1,0 e 2,0  $\mu$ M em 0,1% DMSO com o meio) por 24 horas em ausência ou presença de *T. gondii* (BECKER *et al.*, 2013). O tratamento foi avaliado nos ensaios seguintes.

#### 4.9 Ensaio de proliferação de *T. gondii* (cepa 2F1)

As células Caco-2 foram cultivadas em placas de 96 poços em uma densidade de  $7,0 \times 10^4$  células/100 $\mu$ l/poço e mantidas por 48 horas a 37°C na estufa. A infecção foi feita conforme descrito anteriormente; após 3 horas, o meio foi removido e o inibidor foi adicionado nas duas concentrações já mencionadas.

O ensaio de proliferação de *T. gondii* foi realizado de acordo com Teo e colaboradores (2007), com algumas modificações. Brevemente, em uma placa de 96 poços, as amostras de parasitos 2F1 (curva padrão de  $1,0 \times 10^6$  a  $15,625 \times 10^3$  parasitos totais) e células Caco-2 infectadas e tratadas com o inibidor para  $\gamma$ -secretase foram lizadas com 100 $\mu$ l do seguinte tampão: RIPA [50mM de tris-HCl, 150mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 1% (peso/volume) de deoxicolato de sódio e 0,1% (peso/volume) de dodecil sulfato de sódio (SDS), pH 7,5] (Sigma) durante 30 minutos, incubadas com 100 $\mu$ l de tampão de ensaio (PBS pH 7,3; 9mM de MgCl<sub>2</sub> e 102mM de  $\beta$ -mercaptoetanol) e 40 $\mu$ l de CPRG (clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactopiranosídeo; Roche Diagnostic) a 6,25mM por 30 minutos adicionais. Após este período, a atividade enzimática de  $\beta$ -galactosidade foi mensurada a 570nm usando leitor de microplacas (Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) e os dados foram apresentados como índice de proliferação de *T. gondii* ( $\beta$ -gal) de acordo com a referencia da curva padrão (limite de detecção da reação de  $15,625 \times 10^3$  parasitos totais).

#### 4.10 Ensaio colorimétrico de Viabilidade celular mediante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) de acordo com Mosmann (1983)

As células Caco-2 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de  $7,0 \times 10^4$  células/100 $\mu$ l/poço e mantidas por 48 horas a 37°C na estufa. A viabilidade das células foi

avaliada mediante o tratamento com o inibidor para  $\gamma$ -secretase com e sem a presença de *T. gondii*. A infecção foi feita como foi descrito anteriormente; após 3 horas, o meio foi removido e o inibidor foi adicionado nas duas concentrações mencionadas anteriormente durante 24 horas. Logo após foram adicionados 90  $\mu$ l de meio DMEM sem soro e 10  $\mu$ l do reagente MTT por poço e incubado por 4 horas a 37°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100  $\mu$ l de SDS 10% por poço e misturado até dissolver os cristais de formazan, resultantes da redução do reagente MTT. Após 30 minutos de incubação, a densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor de placa (Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A porcentagem de células viáveis foi calculada em todas as condições experimentais em relação ao controle (células não tratadas), que correspondeu a 100% de viabilidade.

#### 4.11 Avaliação da expressão de RNA mensageiro para IL-8 e IL-1 $\beta$

Após os 20 dias de cultivo das células Caco-2, foi feita a infecção conforme foi descrita anteriormente. Também foi realizado a estimulação das células Caco-2 com rIFN- $\gamma$  humano (Invitrogen) com uma concentração de 25 ng/ml por 24 horas.

##### 4.11.1 Extração de RNA mensageiro e obtenção do DNA complementar

A extração do RNA total foi realizada com o reagente Trizol® (Invitrogen), seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Gibco BRL, USA). Para lizar as células, foi utilizado 1,0 ml de Trizol por  $1,0 \times 10^6$  células, seguido de agitação vigorosa com a pipeta por 30 segundos, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1,0 ml de Trizol usado foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio, as amostras foram homogeneizadas em “vortex” e centrifugadas a  $1.2000 \times g$  por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi coletada em um tubo novo e foi adicionado o mesmo volume de isopropanol 100% gelado, agitado em “vortex” e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente para precipitar o RNA da fase aquosa. Novamente os tubos foram centrifugados a  $12000 \times g$  por 10 minutos a 4°C. Feito isso, foi acrescentado 1,0 ml de etanol 70% por 1,0 ml de Trizol, sendo a amostra homogeneizada em “vortex”, seguido de nova centrifugação a  $7.500 \times g$  por 5 minutos a 4°C. As amostras de RNA foram suspensas em 20  $\mu$ l de água deionizada e livre de RNase, sendo, então, as amostras armazenadas a -80° C. Para a obtenção da concentração de RNA/ $\mu$ l foi feita uma diluição de 1:50 nas amostras e determinadas usando o aparelho GeneQuant (GE, USA).

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através de reação de transcrição reversa, com a utilização de transcriptase reversa (Superscript II) e 5µg de RNA. As reações foram realizadas utilizando a enzima Taq polimerase no termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA). Todas as amostras também foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para  $\beta$ -actina e GAPDH, utilizados como controles positivos da reação de amplificação. A amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências dos primers utilizados (Tabela 1).

Gene	Sequência
h $\beta$ -actina	FW 5`-GCCAACCGCGAGAAGATGA-3` RW 5`-CATCACGATGCCAGTGGTA-3`
hGAPDH	FW 5`-ATGCCATCACTGCCACCC-3` RW 5`-ACCTTGCCCACAGCCTTG-3`
hIL-1 $\beta$	FW 5`-TTATTACAGTGGCAATGAGGATGAC-3` RW 5`-GTGGTGGTTCGGAGATTCGTAG-3`
hIL-8	FW 5`-GAAGTTTTTGAAGAGGGCTGAGAA-3` RW 5`-CCTACAACAGACCCACACAATACAT-3`

**Tabela 1 - Sequência de Primers.** A sigla h representa que são primers para humano.

#### 4.11.2 Quantificação das mensagens de IL-8 e IL-1 $\beta$ por reação de PCR quantitativa (qPCR)

A expressão quantitativa dos genes foi analisada através de reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema SYBR Green (Invitrogen - USA) no aparelho ABI PRISM – 7500 sequence detection system (Applied Biosystems – USA). Primers adequados para tal reação foram criados a partir do programa Primer Express, com exceção do gene para  $\beta$ -actina (Becker et al., 2013). O cDNA foi utilizado juntamente com reagentes SYBR Green, determinado pelo fabricante. Os parâmetros da reação foram àqueles determinados pelo aparelho, utilizando-se a temperatura de 60°C para anelamento. Nas reações com o SYBR Green, um ciclo final de 20 minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C foi empregada para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de TC (threshold cycle) ou linha de corte, definido após a reação, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atinge um dado limiar, que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado.

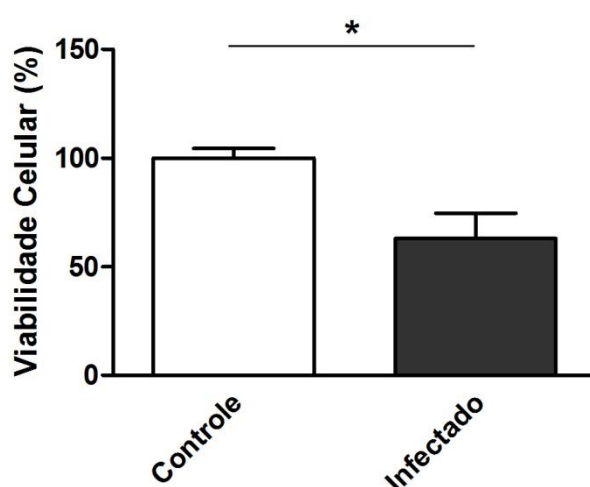
#### 4.12 Análise estatística

Todos os dados foram analisados como media e desvio padrão de dois ou três experimentos independentes realizados em triplicata. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni e as comparações entre condições pares foram realizadas pelo teste *t* de Student, utilizando o programa GraphPad Prisma versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

## 5. Resultados

### 5.1 Diminuição da viabilidade celular das células Caco-2 infectadas com taquízoítos de *T. gondii*

A viabilidade das células infectadas por *T. gondii* foi primeiramente avaliada pelo ensaio colorimétrico de viabilidade celular mediante MTT. A porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle (células não infectadas), que corresponde a 100% de viabilidade. Neste caso, pode-se observar um decréscimo da viabilidade das células Caco-2 infectadas com taquízoítos, em comparação com as não infectadas (Figura 3).

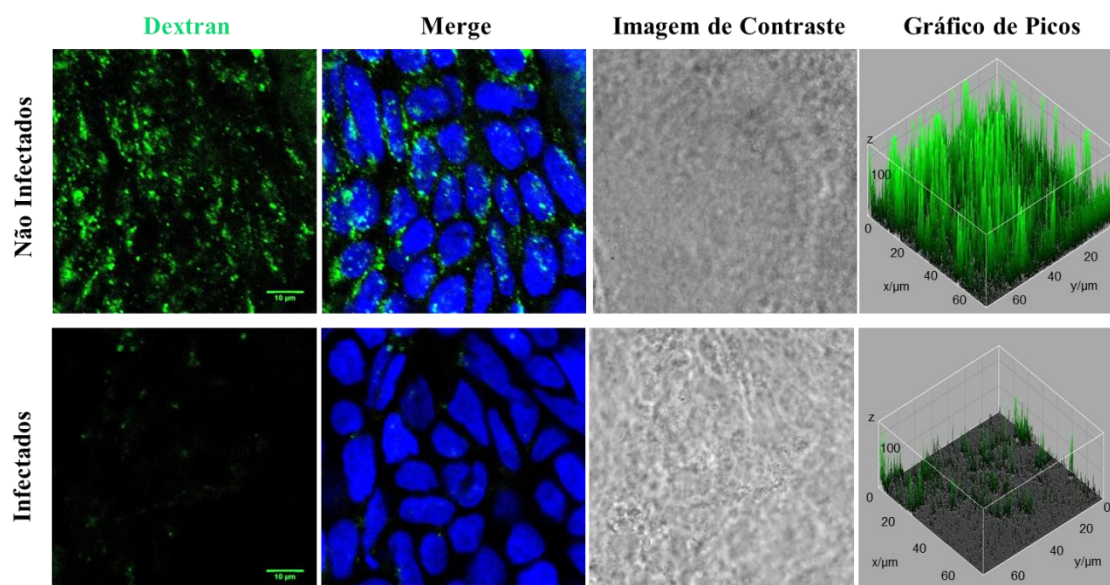


**Figura 3 - Diminuição da viabilidade celular das células Caco-2 infectadas com taquízoítos de *T. gondii*.** As células ( $7,0 \times 10^4$  células/100µl/poço) foram plaqueadas em sextuplicata em placas de 96 poços por 48 horas. O ensaio de viabilidade foi feito após as 24 horas de infecção. A porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle (células não infectadas), que corresponde a 100% de viabilidade. \*  $P < 0,05$ .

### 5.2 A endocitose do FITC-Dextran pelas células Caco-2 diminui na presença de *T. gondii*

Para avaliar a capacidade endocítica do carboidrato dextran pelas células Caco-2, imagens foram capturadas no microscópio confocal (Figura 4). Foi observado maior endocitose de FITC-Dextran pelas células não infectadas em comparação com as células infectadas com *T. gondii*. O gráfico de picos para ambas as condições, infectado e não infectado, representam a intensidade da fluorescência pelo carboidrato associado a FITC, que é um fluorocromo. Com todo o painel de imagens da Figura 4, observamos que as células Caco-2, na presença do parasito, endocitam em uma menor quantidade o carboidrato dextran.

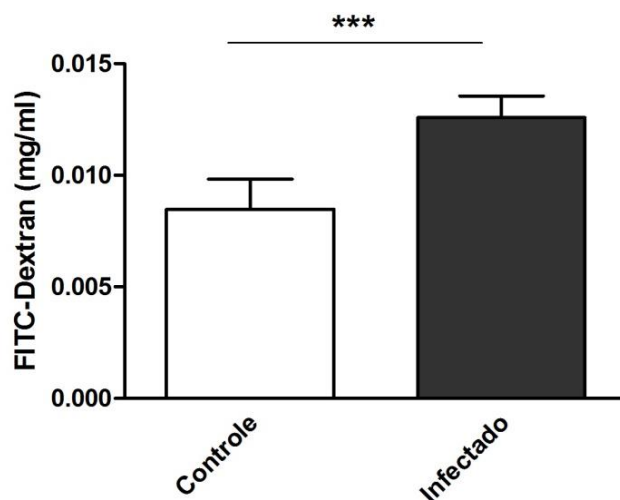




**Figura 4 - A endocitose de FITC-Dextran pelas células Caco-2 não infectadas é maior em comparação com as células infectadas com *T. gondii*.** FITC-Dextran (4kDa) foi diluído em meio DMEM, em uma concentração final de 1mg/ml e incubado por 1 hora em células Caco-2. A infecção das células foi feita 24 horas antes do tratamento com o carboidrato. Os núcleos foram marcados com To-PRO 3 (1:2000). O gráfico de picos indica a intensidade da fluorescência da foto em três planos. Barra de escala de 10µm. Zoom 2x.

### 5.3 A integridade da barreira epitelial das células Caco-2 foi alterada pela infecção com *T. gondii*.

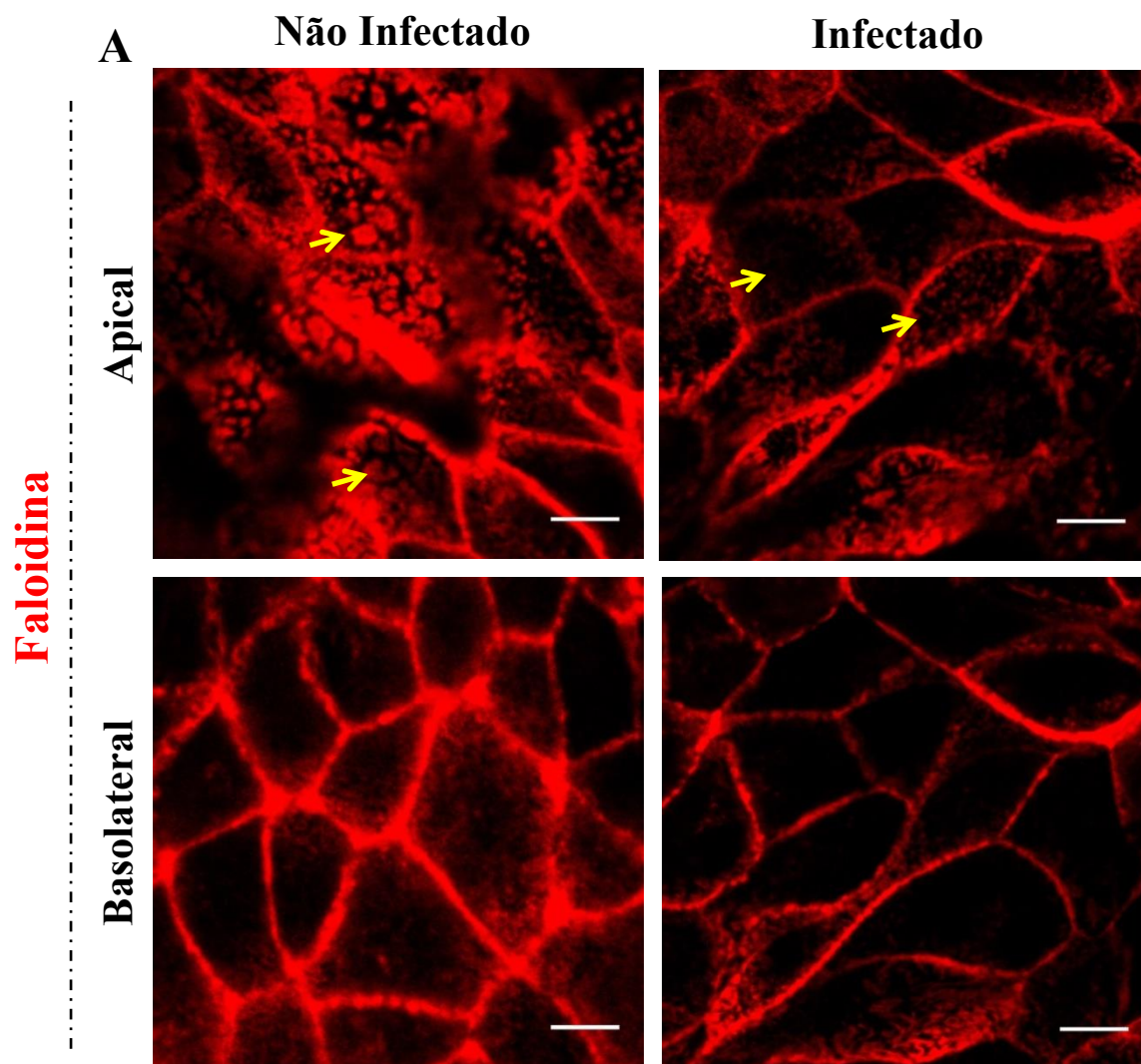
A permeabilidade paracelular foi medida como o fluxo do carboidrato dextran entre as células. Foi utilizado o modelo de *transwell* onde as células Caco-2 foram cultivadas por 20 dias. Após a infecção com *T. gondii* por 24 horas, as células foram incubadas com 1mg/ml de FITC-dextran (4 kDa) por 1 hora. A infecção com *T. gondii* resultou no aumento da permeabilidade do carboidrato do compartimento superior ao compartimento inferior (Figura 5). Isto foi determinado pela quantidade do dextran contido no meio de cultivo do compartimento inferior do *transwell*. A concentração do dextran no compartimento inferior de células infectadas com *T. gondii* foi de  $0,01258 \pm 0,0009746$  mg/ml quando comparado com as células não infectadas  $0,008476 \pm 0,001350$  mg/ml ( $p < 0,0001$ ) indicando a maior passagem do carboidrato quando as células foram infectadas com o parasito.



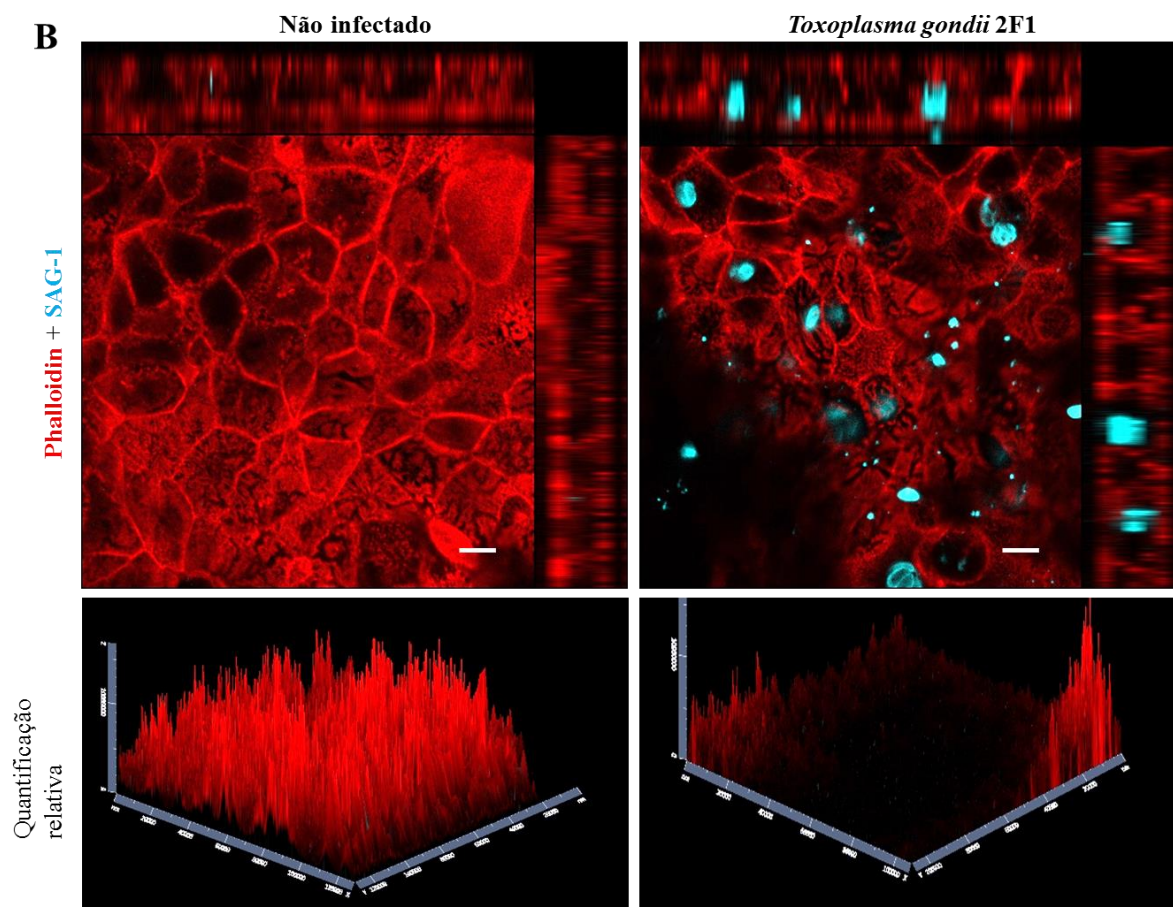
**Figura 5 - *T. gondii* aumenta a permeabilidade paracelular de FITC-Dextran nas células Caco-2.** FITC-Dextran (4kDa) foi diluído em meio DMEM, em uma concentração final de 1mg/ml, colocado no compartimento superior e incubado por 1 hora nas células Caco-2 infectadas ou não. O tratamento com o carboidrato foi feito após as 24 horas de infecção. Foi coletado o meio do compartimento inferior do *transwell* e feita a mensuração em um leitor de placas em relação à curva padrão. Concentrações de dextran em mg/ml. \*\*\*  $P < 0,0001$ .

#### 5.4 Alteração do citoesqueleto de actina de células Caco-2 na infecção por *T. gondii*

A preservação das microvilosidades das células Caco-2 mediante infecção por *T. gondii* foi avaliada através da detecção das fibras de actina com o reagente faloidina, que se une especificamente a esta proteína. Após 20 dias de cultivo, as células foram infectadas com *T. gondii* por 24 horas. Após o tempo de infecção, pode-se observar na parte apical, a diminuição da quantidade de microvilosidades nas células Caco-2 em comparação com as células não infectadas (Figura 6A). A parte basolateral das células também foi avaliada e observou-se que a fluorescência das fibras de actina das células infectadas marcadas com faloidina diminuiu e as células não infectadas apresentaram maior fluorescência dessas fibras (Figura 6A).



**Figura 6A - Alteração do citoesqueleto de actina de células Caco-2 na infecção por *T. gondii*.** As células foram cultivadas por 20 dias em lamínulas de vidro e infectadas por 24 horas. Imagens da parte apical da célula (painel superior); e imagens da parte basolateral da célula (painel inferior), na presença e ausência de *T. gondii*. Zoom 2x. Para a marcação das fibras de actina foi utilizado o reagente faloidina (1:300) conjugado com Alexa flúor 564, e incubado por 1 hora. As lamínulas foram observadas no microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta. Setas em amarelo indicam as microvilosidades das células. Barra de escala de 10µm.



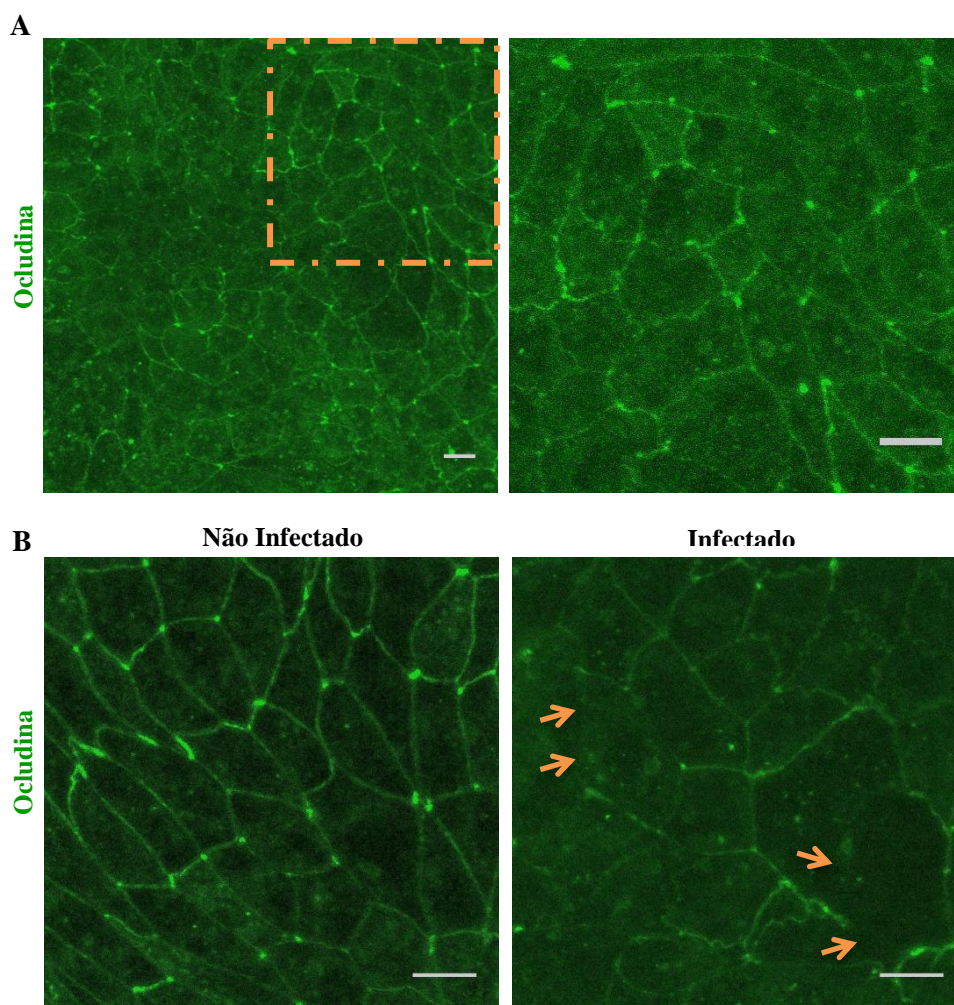
**Figura 6B - Alteração do citoesqueleto de actina de células Caco-2 na infecção por *T. gondii*.** As células foram cultivadas por 20 dias em lamínulas de vidro e infectadas por 24 horas. Células em presença e ausência de taquizóitos de *T. gondii* (celeste). Na parte inferior das imagens, gráficos de picos mostram a intensidade da fluorescência (quantificação relativa) de ambas as condições. Zoom 2x. Para a marcação das fibras de actina e taquizóitos foram utilizados o reagente faloidina (1:300) conjugado com Alexa flúor 564, e anticorpo de camundongo IgG anti-SAG1 (1:300), respectivamente; e incubados por 1 hora. As lamínulas foram observadas no microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta. Barra de escala de 10µm.

O software ZEN 2012 SP2 foi utilizado para analisar as imagens do microscópio confocal. O programa permite uma análise de quantificação relativa com base na quantidade de fluorescência transmitida pelo fluorocromo utilizado (faloidina) que marca especificamente as fibras de actina (Figura 6B). A análise de quantificação relativa mostra um histograma onde a intensidade da fluorescência é maior nas células não infectadas em comparação com as infectadas, mostrando que a infecção por *T. gondii* induz alterações no citoesqueleto de actina nas células intestinais infectadas. Observamos também imagens das células no plano X (horizontal) e Y (vertical), onde podemos observar o parasito dentro das células, confirmando assim a infecção por *T. gondii* (Figura 6B).



### 5.5 A infecção por *T. gondii* induz uma diminuição de ocludina nas células Caco-2

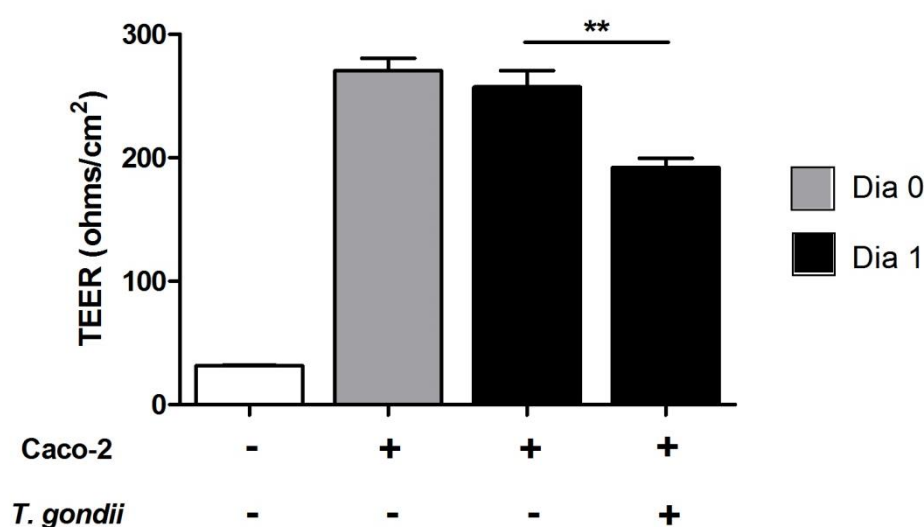
Para verificar se a infecção por *T. gondii* altera a junção de oclusão e a expressão da proteína ocludina, avaliamos a distribuição da proteína por imunofluorescência em células infectadas e não infectadas. A proteína da zônula de oclusão, ocludina, apresenta uma expressão relevante nas células Caco-2. Foi observado que a proteína ocludina, na porção apical, está presente junto com a membrana celular de forma contínua, dando uma aparência de cinto para estabelecer a união entre células (Figura 7A). As imagens mostram que a localização da ocludina é menor e de forma descontínua nas células infectadas quando comparado com células não infectadas com *T. gondii* (Figura 7B).



**Figura 7 – A infecção por *T. gondii* induz uma diminuição de ocludina nas células Caco-2.** As células Caco-2 ( $5,0 \times 10^5$  células/300µl/poço) foram cultivadas em placas de 24 poços em lamínulas por 20 dias. A) Células Caco-2 após 20 dias de cultivo mostram o padrão tipo rede da proteína ocludina. Foto esquerda: Zoom 1x; Foto direita: área marcada da foto esquerda. B) Células Caco-2 não infectadas e infectadas com taquizoítos de *T. gondii*. Setas em laranja mostram a descontinuidade da proteína ocludina. A infecção foi feita em uma proporção de 5 parasitos: 1 célula. A marcação para ocludina foi feita com anticorpo anti-occludina produzido em coelho. O padrão de tipo rede é afetado pela presença do parasito. Zoom 2x. As lamínulas foram observadas no microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta. Barra de escala de 10µm.

### 5.6 A Resistência Elétrica Transepitelial das células Caco-2 diminui na infecção por *T. gondii*

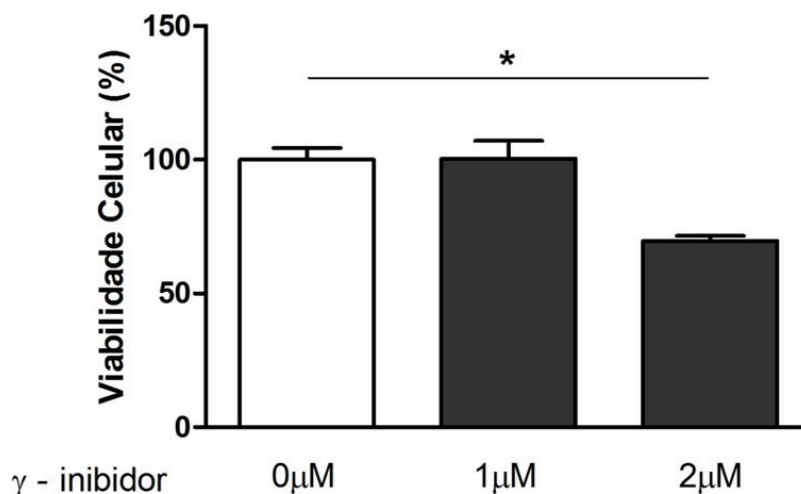
Para determinar se a resistência elétrica transepitelial (TEER) das células foi afetada pelo parasito, as células foram cultivadas em placas no sistema *transwell* por 20 dias, infectadas por 24 horas e TEER foi mesurada no aparelho EVON<sup>2</sup> voltôhmetro. Na Figura 8, os valores são descritos como ohms/cm<sup>2</sup>. O dia zero representa o dia antes da infecção (coluna cinza), e o dia um representa o dia após as 24 horas de infecção (colunas pretas). Observa-se que existe uma diminuição da TEER nas células infectadas (192,2 ohms/cm<sup>2</sup>), comparadas com as células não infectadas (257,3 ohms/cm<sup>2</sup>) (Figura 8).



**Figura 8 - A Resistência Elétrica Transepitelial das células Caco-2 diminui na infecção por *T. gondii*.** As células Caco-2 foram cultivadas em *inserts* de membrana (*Transwells*) por 20 dias. A infecção foi feita por 24 horas. As mensurações dos *inserts* foram feitas no aparelho EVON<sup>2</sup> voltôhmetro, duas vezes por *insert*. A coluna branca indica só o *insert* com meio. A coluna cinza indica o dia 0, 24 horas antes da infecção. A primeira coluna preta indica as células sem infectar; a segunda coluna preta representa as células Caco-2 infectadas após 24 horas. \*\*  $P < 0,01$ .

### 5.7 Repercussão na viabilidade das células Caco-2 na presença do inibidor de $\gamma$ -secretase

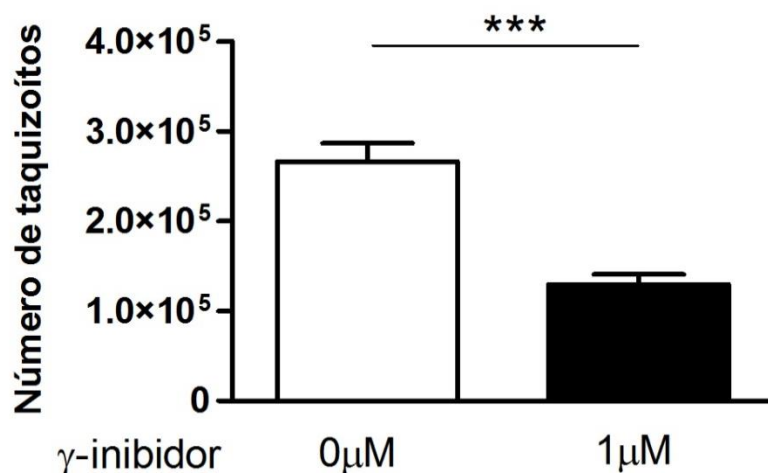
Para verificar o papel da via de sinalização Notch, foi utilizado o inibidor de  $\gamma$ -secretase, uma enzima essencial para liberar o domínio intracelular Notch (NICD). O primeiro passo foi verificar se o inibidor de  $\gamma$ -secretase interferiria na viabilidade das células Caco-2, através do método do MTT. Observou-se que as células tratadas com 1,0  $\mu$ M do inibidor apresentaram uma viabilidade de 100%. No caso das células tratadas com a concentração de 2,0  $\mu$ M, estas apresentaram queda na viabilidade, em torno de 30% (Figura 9). Então foi escolhida a concentração de 1,0  $\mu$ M para os próximos experimentos.



**Figura 9 - Viabilidade de células Caco-2 tratadas com o inibidor de proteína  $\gamma$ -secretase da via Notch.** As células ( $7,0 \times 10^4$  células/100 $\mu$ l/poço) foram plaqueadas em sextuplicata em placas de 96 poços por 48 horas. O ensaio de viabilidade foi feito após 24 horas de tratamento com o inibidor de  $\gamma$ -secretase (1 $\mu$ M e 2 $\mu$ M). A porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle (células sem tratamento), que corresponde a 100% de viabilidade. \*  $P < 0,05$ .

#### 5.8 Diminuição do índice de proliferação dos taquizoítos de *T. gondii* nas células Caco-2 na presença do inibidor de $\gamma$ -secretase

Para verificar se a inibição da via de sinalização Notch interferiria na proliferação de *T. gondii*, o inibidor do complexo proteico  $\gamma$ -secretase foi utilizado em células infectadas pelo parasito e a avaliação da multiplicação desse foi realizada através do ensaio de proliferação com a cepa 2F1 de *T. gondii*. Nas células tratadas com o inibidor, com a concentração de 1,0  $\mu$ M, observamos que a proliferação dos parasitos diminuiu consideravelmente comparada com as células não tratadas (Figura 10).

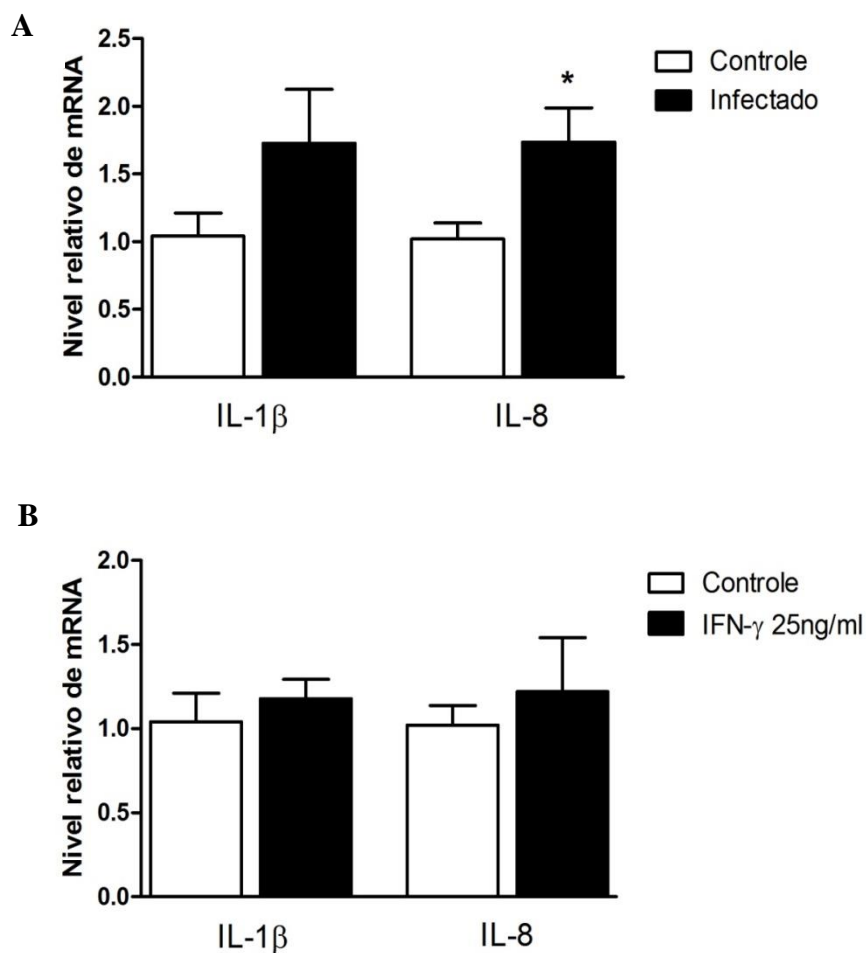


**Figura 10 - Diminuição do índice de proliferação dos taquizoítos de *T. gondii* nas células Caco-2 na presença do inibidor de  $\gamma$ -secretase.** As células ( $7,0 \times 10^4$  células/100μl/poço) foram plaqueadas em sextuplicata em placas de 96 poços por 48 horas. O tratamento das células com o inibidor para  $\gamma$ -secretase foi feito após as primeiras 3 horas de infecção. O ensaio de proliferação intracelular de taquizoítos foi feito após as 24 horas de infecção. Os dados foram apresentados como índice de proliferação de *T. gondii* ( $\beta$ -gal) de acordo com a referencia a curva padrão (limite de detecção da reação de  $15,625 \times 10^3$  parasitos totais). \*\*\*  $P < 0,0001$ .

#### 5.9 A expressão de citocinas inflamatórias aumenta nas células Caco-2 infectadas com *T. gondii*

Foram avaliadas duas citocinas nas células Caco-2, IL-8 e IL-1 $\beta$ , na presença e ausência de *T. gondii*. Além disso, as células foram estimuladas com uma concentração de rIFN- $\gamma$  (25 ng/ml). No caso de IL-8, observamos que as células Caco-2 infectadas com o parasito têm um aumento ( $P = 0,0422$ ) na expressão de RNAs mensageiros em comparação com as células sem infectar. Para o caso de IL-1 $\beta$ , observamos uma tendência a aumentar nas células infectadas (Figura 11A). Para o caso das células estimuladas com IFN- $\gamma$ , observamos que a expressão para ambas citocinas tem uma tendência a aumentar versus as células sem estimulação (Figura 11B).





**Figura 11 - A expressão de citocinas inflamatórias aumenta nas células Caco-2 infectadas com *T. gondii*.**

A) Comparação da expressão de citocinas entre células Caco-2 sem infectar, e células infectadas com *T. gondii*. B) Comparação da expressão de citocinas entre células Caco-2 na presença e ausência de rIFN- $\gamma$  humano. Após 20 dias de cultivo das células Caco-2, foi feito a estimulação com rIFN- $\gamma$  humano (25 ng/ml) por 24 horas. A infecção foi realizada por 24 horas para avaliar o efeito sobre a expressão de RNAs mensageiros das citocinas testadas. Os dados são apresentados como o nível relativo de RNAs mensageiros. \*  $P < 0,05$ .

## 6. Discussão

*Toxoplasma gondii* é um parasito altamente adaptado, refletindo em sua ampla gama de hospedeiros intermediários. Entretanto, a reprodução sexuada ocorre apenas no nível do epitélio intestinal de felídeos e os mecanismos pelos quais o parasito estabelece infecção no trato intestinal dos hospedeiros ainda não estão bem estabelecidos. Dessa forma, o presente estudo teve como propósito a avaliação *in vitro* das alterações desta mucosa quando infectadas com taquizoitos de *T. gondii*, pois constitui o início do ciclo biológico do parasito, assim como é a principal porta de entrada deste. Observamos uma nítida modificação morfológica e funcional do epitélio intestinal em decorrência da infecção, o que pode fornecer importantes informações ao entendimento da dinâmica infecciosa de *T. gondii* no epitélio intestinal.

O desempenho da célula hospedeira durante a invasão pelo parasito tem sido estudado principalmente com taquizoítos de *T. gondii*, os quais podem invadir células hospedeiras com uma alta frequência e sincronidade (BARGIERI et al., 2014). Sabendo que o epitélio intestinal é um importante sítio para o primeiro contato do parasito com o hospedeiro, as consequências da barreira epitelial são importantes fatores patogênicos que permitem que *T. gondii* possa infectar o hospedeiro, favorecendo a inflamação do intestino e translocação de bactérias através do epitélio (EGAN et al., 2012; LEI et al., 2014).

A habilidade do epitélio para constituir uma barreira de difusão aos solutos entre os compartimentos celulares é controlada por duas vias: 1) a via transcelular, onde depende de transportadores e canais dependentes de energia e que estão distribuídos nas membranas apicais e basolaterais; e 2) a via paracelular, onde as proteínas da zônula de oclusão, localizadas no espaço intercelular apical, regulam a difusão passiva dos íons e pequenos solutos sem carga (POWELL, 1981; SCHNEEBERGER; LYNCH, 2004).

Utilizando o modelo de estudo *in vitro* - células Caco-2, um dos aspectos notados em nosso estudo a respeito das modificações da barreira do epitélio intestinal, constou de um decréscimo da capacidade endocítica das células e um aumento do fluxo do dextran que é consequência da perda da polaridade celular. Possivelmente, este fato ocorreu em virtude de alterações da membrana celular causadas pela infecção por *T. gondii*. De qualquer forma, a perda de estabilidade celular pode alterar a capacidade de endocitose das células Caco-2, já que a absorção mediada por este mecanismo de transporte é uma característica marcante deste tipo de célula (SAI et al., 1998).

Alterações do epitélio intestinal em infecção por *T. gondii* já foram demonstradas *in vivo*, na mucosa intestinal de gatos. Neste caso, infecção por *T. gondii* resultou em degenerações mitocondriais e do retículo endoplasmático, assim como a encurtamento significativo dos microvilos das células epiteliais (FERGUSON, HUTCHISON, SIIM, 1976). Esses dados estão de acordo com nossos achados não apenas em termos de similaridades de consequências da infecção no nível do epitélio intestinal, mas também reforça a importância em termos de viabilidade da utilização da linhagem Caco-2 refletindo de forma semelhante ao que ocorre *in vivo*.

Além da alteração da capacidade de endocitose das células, observamos uma perda da viabilidade celular em decorrência da infecção com taquizoítos. Estas alterações provavelmente promoveram a migração do parasito através da camada de células polarizadas, o que constitui um importante determinante da virulência e invasão de *T. gondii* (BARRAGAN; SIBLEY, 2002).

A camada do epitélio gastrointestinal, em homeostase, forma uma barreira seletiva onde os microrganismos e a maioria dos antígenos são controlados. A interação entre o epitélio e a população de microrganismos está baseada na modulação da permeabilidade intestinal e os mecanismos de defesa da mucosa intestinal. A espessura do epitélio intestinal é dinâmica, não obstante o principal mecanismo e o efeito sobre a dinâmica da permeabilidade do epitélio intestinal são pouco estudados (FIORENTINO et al., 2014). A integridade da camada do epitélio intestinal é preservada pelos complexos de junção intercelular, onde as junções de oclusão funcionam como uma barreira para a difusão lateral dos componentes apicais e basolaterais, e como controle da rota paracelular (SCHNEEBERGER; LYNCH, 2004). Porém, existem poucas informações sobre a regulação das junções de oclusão na presença de infecções por parasitos, dentre eles *T. gondii*.

Outro aspecto importante encontrado em nosso estudo refere-se a que a exposição das células epiteliais Caco-2 a *T. gondii* levou a uma diminuição do componente proteico das junções de oclusão conhecido como ocludina. De fato, alguns estudos têm descrito uma alteração da rede de ocludina, fosforilação e desacoplamento do complexo de junção de oclusão na presença de infecção por bactérias tais como *Salmonella typhi* e *Shigella* (FIORENTINO et al., 2013; FIORENTINO et al., 2014). Como parasito intracelular obrigatório e invasor do epitélio intestinal, acreditamos que este padrão de alteração da proteína ocludina também se estenda para *T. gondii*, conforme nossos resultados sugerem.

Considerando o parasitismo obrigatório, é esperado que este protozoário possa fazer uso das proteínas das junções de oclusão (*tight junctions* - TJ) para invadir o epitélio intestinal. Ocludina, como uma das proteínas das junções de oclusão, contribui para manter a integridade do epitélio intestinal e, possivelmente, seja um alvo importante de *T. gondii*. Al-Sadi e colaboradores (2011) relataram que a diminuição de ocludina nas células Caco-2 e em intestinos de camundongos utilizando RNAs de interferência levou ao aumento do fluxo de macromoléculas, sugerindo que a ocludina tem um papel importante na manutenção da barreira epitelial.

Neste caso, o aumento do fluxo macromoléculas reflete na desorganização do epitélio intestinal, facilitando a invasão por patógenos. Por isso a baixa quantidade de ocludina observada nas células Caco-2 infectadas, comparadas com as células não infectadas, demonstram que a infecção pelo parasito leva a alteração nas proteínas de junção de oclusão. Weight e Carding (2012) propõem que *T. gondii* utilize o complexo proteico de junções de oclusão como porta de entrada para invadir os enterócitos e conseguir sua disseminação na mucosa intestinal, além de apresentar uma influencia na alteração da distribuição de ocludina. Esses eventos promovem justamente a transmigração do parasito através do epitélio intestinal.

Vários trabalhos descrevem que a linhagem de células Caco-2 é popularmente conhecida como um modelo *in vitro* importante do epitélio intestinal para o estudo e avaliação de absorção de nutrientes, aminoácidos, vitaminas e candidatos a fármacos (BIGANZOLI et al., 1999; ARTUSSON; PALM; LUTHMAN, 2001; ZEROUNIAN; LINDER, 2002; KIM et al., 2014). A resistência elétrica transepitelial (TEER) é um método utilizado para quantificar e avaliar a permeabilidade e transporte de substratos através da barreira epitelial (BENSON; CRAMER; GALLA, 2013). Em nossos resultados encontramos que existe uma diminuição da TEER nas células Caco-2 infectadas com o parasito. Isto sugere, uma vez mais, que a integridade da camada de células Caco-2 é modificada por *T. gondii*.

Trabalhos utilizando células Caco-2 expostas a compostos proteicos de bactérias como *Salmonella* e sobrenadante de *Helicobacter pylori* diminuem a TEER (LYTTON et al., 2005; FANG et al., 2010;). Além disso, trabalhos utilizando bactérias como *Shigella* e *Salmonella* Thypy em células Caco-2 têm um efeito dose-dependente sobre a TEER (FIORENTINO et al., 2013; FIORENTINO et al., 2014). Ainda, Griffiths e colaboradores (1994) utilizaram células Caco-2 infectadas com oocistos (25% de taxa de eclosão) do protozoário *Cryptosporidium parvum* e mostram também que existe uma diminuição da TEER. Com tudo isto, ressaltamos

que nosso trabalho é o primeiro estudo onde se avalia a influência de um patógeno sanguíneo e tissular na estrutura do epitélio intestinal durante a infecção.

Portanto, acreditamos que a diminuição da proteína ocludina, baixa atividade endocítica das células Caco-2, aumento do fluxo do carboidrato dextran e, conseqüentemente, uma diminuição da TEER; confirmam que *T. gondii* tem a habilidade de modificar a barreira epitelial intestinal para assim facilitar a invasão das células hospedeiras.

Em relação à expressão de citocinas inflamatórias, observamos um aumento na expressão de IL-8 e uma tendência a maior produção de IL-1 $\beta$  nas células infectadas com *T. gondii*. Maillot e colaboradores (2000) avaliam as células Caco-2 infectadas com o protozoário *C. parvum* e foi observado, mediante o método de ELISA, um aumento da produção de IL-8. Os níveis de expressão de citocinas encontrados, juntamente com o decréscimo da quantidade de ocludina encontrado em nosso estudo, nos leva a crer em uma relação de causa-efeito entre citocinas e as proteínas de oclusão. Dessa forma, a tendência de maior produção de IL-1 $\beta$  por células Caco-2 pode ter também influenciado na diminuição da proteína ocludina e aumentado na permeabilidade intercelular dessas células. De fato, as células Caco-2 estimuladas com TNF- $\alpha$ , outro mediador inflamatório, por 48 horas, apresentam um aumento da permeabilidade das junções de oclusão via ativação de NF- $\kappa$ B (MA et al.; 2005). Ainda, Van de Walle e colaboradores (2010) utilizam células Caco-2 estimuladas com diferentes citocinas, observando uma maior influência da citocina IL-1 $\beta$  na redução da integridade da barreira celular. Dessa forma, acreditamos que o parasito possa ter contribuído com o aumento da produção de citocinas pro-inflamatórias, o que contribuiu para a diminuição da quantidade de ocludina nas células infectadas conforme discutido anteriormente.

A linhagem de células de carcinoma de cólon, Caco-2, tem a propriedade de se diferenciar espontaneamente, sem a presença de indutores; exibindo um padrão estrutural e funcional de enterócitos maduros. Em cultivos pós-confluentes, as células estão cobertas por microvilosidades associados com a polarização da camada epitelial de células Caco-2 (PINTO et al. 1983). Em nosso estudo, esta integridade das microvilosidades também foi alterada em decorrência da infecção pelo parasito.

Parasitos pertencentes ao filo Apicomplexa invadem rapidamente as células hospedeiras, mediante a ativação de seu motor actinmiosina, para assim gerar o movimento em direção à formação do vacúolo parasitóforo (DELORME-WALKER et al., 2012). Entretanto, Gonzalez e colaboradores (2009) demonstraram que os filamentos de actina da

célula hospedeira, os quais estão acoplados às junções de oclusão, são necessárias para uma apropriada internalização do taquizoíta na célula alvo. Além disso, quando as células alvo foram pre-tratadas com jasplakinolida, droga que induz a polimerização de filamentos de actina, estas não conseguem ser invadidas pelo parasito. Com tudo isto, podemos considerar que o uso dos filamentos de actina do hospedeiro, pelo parasito, é fundamental para uma invasão produtiva.

Delorme-Walker e colaboradores (2012) mostraram que os taquizoítos de *T. gondii* secretam uma proteína, denominada toxofilina. Essa proteína aceleraria a quebra dos filamentos de actina, o que faria que a célula hospedeira perdesse o citoesqueleto de actina, facilitando a invasão pelo parasito. Além disso, já foi demonstrado, em um estudo *in vivo* em felinos, a alteração das fibras de actina que reflete na perda de microvilosidades (FERGUSON, HUTCHISON, SIIM, 1976).

Na formação do intestino, a via de sinalização Notch tem um papel importante, especificamente, no desenvolvimento embrionário do tubo digestivo e, na diferenciação e proliferação das células progenitoras e maduras (YANG et al., 2001; CROSNIER et al., 2005). Observamos que houve uma diminuição da proliferação do parasito nas células Caco-2 quando existe uma interferência da via Notch utilizando o inibidor, em uma concentração de modo que não interfira com a viabilidade das células.

Dahan e colaboradores (2011) discutem que a perda da expressão de Notch-1, um dos receptores da via de sinalização Notch, nas células Caco-2 está relacionada com a diminuição da resistência transepitelial e desregulação da expressão e localização das proteínas de junção de oclusão. Além disso, camundongos *knock down* para Notch-1 tiveram uma diminuição da expressão das proteínas de junção de oclusão, e um aumento da permeabilidade do epitélio intestinal (MATHERN et al., 2014).

Dessa forma, acreditamos que a via de sinalização Notch é importante para manter a integridade da barreira epitelial do intestino, e que a interferência do parasito no nível intestinal também se estende à utilização desta importante via de sinalização nas células epiteliais. Ainda não está claro para nós como a interferência na via de sinalização Notch poderia interferir na proliferação do parasito, possivelmente poderia estar interferindo na expressão de moléculas envolvidas na interação parasito-hospedeiro.

O epitélio intestinal apresenta uma dinâmica de manutenção da homeostase altamente eficaz, considerando que este é um local amplamente sujeito à entrada de uma grande diversidade de agentes patogênicos, bem como no estabelecimento de uma vasta microbiota.

Neste aspecto, a função de proteção da mucosa intestinal passa a ser tão importante quanto a absorptiva, sendo a primeira desempenhada não apenas por um mecanismo imunológico, mas também pela manutenção da integridade da mucosa – em grande extensão pelas proteínas de junção, como ocludina.

Paralelamente, *T. gondii* apresenta uma intrincada habilidade de subverter esta barreira e, consequentemente, estabelecer uma infecção invasiva. Neste caso, nosso estudo demonstrou que este protozoário altera não apenas o epitélio no nível de microvilosidades, mas também desorganizando e inabilitando as células intestinais, em termos de endocitose, tornando-a mais vulnerável ao parasito. Neste aspecto, demonstramos a importância da ocludina e sua influencia na fisiologia da célula Caco-2 a qual foi alterada.

Outros estudos necessitam ser realizados no sentido de se avaliar outros componentes proteicos de junção celular; além de mensurar a expressão de outras citocinas. De qualquer forma, acreditamos que os resultados deste estudo possam trazer uma compreensão mais detalhada das consequências da infecção por *T. gondii* no epitélio intestinal, o principal sítio de infecção e invasão pelo parasito.

## 7. Conclusões

Sobre as junções de oclusão, consideramos que são fatores proteicos importantes que mantêm a integridade da camada de células Caco-2 e que na presença de *T.gondii*, essa integridade é afetada de maneira drástica. Dados como a mensuração da TEER, a avaliação da permeabilidade paracelular mostram que o parasito auxilia na perda da polaridade do epitélio intestinal. Além disso, o parasitismo causa modificações no citoesqueleto de actina e endocitose do carboidrato dextran nas células Caco-2 resultando na diminuição da superfície de absorção e na taxa de endocitose. Junto com a modulação da expressão das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-8, os resultados revelam e sustentam como o parasito pode alterar o epitélio em nível morfológico, fisiológico e molecular, com o fim de ter uma invasão produtiva.

Por fim, consideramos que novos ensaios devem ser feitos, especificamente relacionados com a via de sinalização Notch, para obter um completo entendimento do efeito que tem *T. gondii* sobre o epitélio intestinal. E claro que estudos *in vivo* são considerados importantes para demonstrar os nossos achados neste trabalho.



### Referências Bibliográficas

- ALVARADO-ESQUIVEL, C.; CAMPILLO-RUIZ, F.; LIESENFELD, O. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in migrant agricultural workers living in poverty in Durango, Mexico. **Parasites & Vectors**, v. 6, doi:10.1186/1756-3305-6-113, 2013.
- AL-SADI, R.; KHATIB, K.; GUO, S.; YE, D.; YOUSSEF, M.; MA, T. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 300, p 1054-1064, 2011.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, S.; RAND, M. D.; LAKE, R. J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. **Science**, v. 284, p. 770-776, 1999.
- ARTUSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 27-43, 2001.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C.; OREFICE, F.; ADDISS, D. G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 55-62, 2003.
- BARGIERI, D.; LAGAL, V.; ANDENMATTEN, N.; TARDIEUX, I.; MEISSNER, M.; MENARD, R. Host cell invasion by Apicomplexan parasites: The junction conundrum. **PLoS Pathogens**, v. 10, p. e1004273, 2014.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, p. 1625-1633, 2002.
- BECKER, S.; OELSCHLAEGER, T. A.; WULLAERT, A.; VLANTIS, K.; PASPARAKIS, M.; WEHKAMP, J.; STANGE, E. F.; GERSEMANN, M. Bacteria regulate intestinal epithelial cell differentiation factors both in vitro and in vivo. **PloS One**, v. 8, p. e55620, 2013.
- BENSON, A.; PIFER, R.; BEHRENDT, C. L.; HOOPER, L. V.; YAROVINSKY, F. Gut commensal bacteria direct a protective immune response against *Toxoplasma gondii*. **Cell Host Microbe**, v. 6, p. 187-196, 2009.
- BENSON, K.; CRAMER, S.; GALLA, H. Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond. **Fluids and Barrier of the Central Nervous System**, v. 10, doi:10.1186/2045-8118-10-5, 2013.
- BIGANZOLI, E.; CAVENAGHI, L.; ROSSI, R.; BRUNATI, M.; NOLLI, M. Use of the Caco-2 cell culture model for the characterization of intestinal absorption of the antibiotics. **II Farmaco**, v. 54, p. 549-599, 1999.
- BIERLY, A. L.; SHUFESKY, W. J.; SUKHUMAVASI, W.; MORELLI, A. E.; DENKERS, E. Y. Dendritic cells expressing plasmacytoid marker PDCA-1 are Trojan horses during *Toxoplasma gondii* infection. **Journal of Immunology**, v. 181, p. 8485-8491, 2008.

BISHOP, J. R.; CRAWFORD, B. E.; ESKO, J. D. Cell surface heparan sulfate promotes replication of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 5395-5401, 2005.

BRAY, S. J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 678-689, 2006.

BUZONI-GATEL, D.; DEBBABI, H.; MENNECHET, F. J.; MARTIN, V.; LEPAGE, A. C.; SCHWARTZMAN, J. D.; KASPER, L. H. Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. **Gastroenterology**, v. 120, p. 914-924, 2001.

CARME, B.; DEMAR, M.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.L. Severe acquires Toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 656-658, 2009.

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, p. 83-89, 2007.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, v. 81, p. 111-122, 2002.

COURRET, N.; DARCHE, S.; SONIGO, P.; MILON, G.; BUZONI-GATEL, D.; TARDIEUX, I. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**, v. 107, p. 309-316, 2006.

CROSNIER, C.; STAMATAKI, D.; LEWIS, J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 349-359, 2006.

CHARDÈS, T.; BUZONI-GATEL, D.; LEPAGE, A.; BERNARD, F.; BOUT, D. *Toxoplasma gondii* oral infection induces specific cytotoxic CD8 alpha/beta+ Thy-1+ gut intraepithelial lymphocytes, lytic for parasite-infected enterocytes. **Journal of Immunology**, v. 153, p. 4596-4603, 1994.

CHENG, H.; LEBLOND, C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. **American Journal of Anatomy**, v. 141, p. 537-561, 1974.

CHEROUTRE, H.; LAMBOLEZ, F.; MUCIDA, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 445-456, 2011.

CROSNIER, C.; VARGESSON, N.; GSCHMEISSNER, S.; ARIZA-MCNAUGHTON, L.; MORRISON, A.; LEWIS, J. Delta-Notch signaling controls commitment to a secretory fate in the zebrafish intestine. **Development**, v. 132, p. 1093-1104, 2005.

DAHAN, S.; RABINOWITZ, K.; MARTIN, A.; BERIN, M.; UNKELESS, J.; MAYER, L.; Notch-1 signaling regulates intestinal epithelial barrier function, through interaction with CD4+ T cells, in mice and humans. **Gastroenterology**, v. 140, p. 550-559, 2011.

DELORME-WALKER, V.; ABRIVARD, M.; LAGAL, V.; ANDERSON, K.; PERAZZI, A.; GONZALEZ, V.; PAGE, C.; CHAUVET, J.; OCHOA, W.; VOLKMANN, N.; HANEIN, D.; TARDIEUX, I. Toxofilin upregulates the host cortical actin cytoskeleton dynamics, facilitating *Toxoplasma* invasion. **Journal of Cell Science**, v. 125, p. 4333-4342, 2012.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1019-1024, 1998.

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 467-475, 2008.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology**, v. 19, p. 155-177, 1972.

DUBEY, J. P.; MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K. The *Toxoplasma gondii* from cat feces. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 132, p. 636-662, 1970.

DUNAY, I. R.; DAMATTA, R. A.; FUX, B.; PRESTI, R.; GRECO, S.; COLONNA, M.; SIBLEY, L. D. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. **Immunity**, v. 29, p. 306-317, 2008.

EGAN, C. E.; COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. **Immunology and Cell Biology**, v. 90, p. 668-675, 2012.

EGAN, C. E.; SUKHUMAVASI, W.; BUTCHER, B. A.; DENKERS, E. Y. Functional aspects of Toll-like receptor/MyD88 signalling during protozoan infection: focus on *Toxoplasma gondii*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 156, p. 17-24, 2009.

FANG, H.; FANG, S.; CHIAU, J.; YEUNG, CH.; CHAN, W.; JIANG, CH.; CHENG, M.; LEE, H. Inhibitory effects of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* on *Salmonella* lipopolysaccharide-induced inflammation and epithelial barrier dysfunction in a co-culture model using Caco-2/peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 573-579, 2010.

FENTRESS, S. J.; BEHNKE, M. S.; DUNAY, I. R.; MASHAYEKHI, M.; ROMMEREIM, L. M.; FOX, B. A.; BZIK, D. J.; TAYLOR, G. A.; TURK, B. E.; LICHTI, C. F.; TOWNSEND, R. R.; QIU, W.; HUI, R.; BEATTY, W. L.; SIBLEY, L. D. Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. **Cell Host Microbe**, v. 8, p. 484-495, 2010.

FERGUSON, D.; HUTCHISON, W.; SIIM, J. The effect of endo-enteric development of *Toxoplasma gondii* on the ultrastructure of epithelial cells of the small intestine of infected cats. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 84, p. 189-195, 1976.

FIorentino, M.; LAMMERS, K.; LEVINE, M.; SZTEIN, M.; FASANO, A. *In vitro* intestinal mucosal epithelial responses to wild-type *Salmonella Typhi* and attenuated typhoid vaccines. **Frontiers in Immunology**, v. 4, doi: 10.3389, 2013.

FIORENTINO, M.; LEVINE, M.; SZTEIN, M.; FASANO, A. Effect of wild-type *Shigella* species and attenuated *Shigella* vaccine candidates on small intestinal barrier function, antigen trafficking, and cytokine release. **PLoS ONE**, v. 9, p. e85211, 2014.

FRE, S.; HANNEZO, E.; SALE, S.; HUYGHE, M.; LAFKAS, D.; KISSEL, H.; LOUVI, A.; GREVE, J.; LOUVARD, D.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S. Notch lineages and activity in intestinal stem cells determined by a new set of knock-in mice. **PloS One**, v. 6, p. e25785, 2011.

FURTADO, G.; SLOWIK, M.; KLEINMAN, H.; JOINER, K. Laminin enhances binding of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to J774 murine macrophage cells. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 2337-2342, 1992.

GONZALEZ, V.; COMBE, A.; DAVID, V.; MALMQUIST, N.; DELORME, V.; LEROY, C.; BLAZQUEZ, S.; MÉNARD, R.; TARDIEUX, I. Host cell entry by Apicomplexa parasites requires actin polymerization in the host cell. **Cell Host & Microbe**, v. 5, p. 259-272, 2009.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GRIDLEY, T. Notch signaling in vascular development and physiology. **Development**, v. 134, p. 2709-2718, 2007.

GRIFFITHS, J. K.; MOORE, R.; DOOLEY, S.; KEUSCH, G.; TZIPORI, S. *Cryptosporidium parvum* infection of Caco-2 cell monolayer induces an apical monolayer defect, selectively increases transmonolayer permeability, and causes epithelial cell death. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 4506-4514, 1994.

HEIMESAAT, M. M.; BERESWILL, S.; FISCHER, A.; FUCHS, D.; STRUCK, D.; NIEBERGALL, J.; JAHN, H. K.; DUNAY, I. R.; MOTER, A.; GESCHER, D. M.; SCHUMANN, R. R.; GOBEL, U. B.; LIESENFELD, O. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 8785-8795, 2006.

HERMISTON, M.; GORDON, J. *In vivo* analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: Essential roles in Adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. **The Journal of Cell Biology**, v. 129, p. 489-506, 1995.

HUYNH, M.; CARRUTHERS, V. *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. **PLoS Pathogens**, v. 2, p. 753-762. 2006

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis--recent developments. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 10-25, 2010.

JUNG, C.; HUGOT, J.; BARREAU, F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. **International Journal of Inflammation**. doi: 10.4061/2010/823710.823710, 2010.

KIM, S.; CHI, M.; YI, B.; KIM, S.; OH, S.; KIM, Y.; PARK, S.; SUNG, J. Three-dimensional intestinal villi epithelium enhances protection of human intestinal cells from bacterial infection by inducing mucin expression. **Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro**, v. 6, p. 1122-1131, 2014.

KIM, T. H.; KIM, B. M.; MAO, J.; ROWAN, S.; SHIVDASANI, R. A. Endodermal Hedgehog signals modulate Notch pathway activity in the developing digestive tract mesenchyme. **Development**, v. 138, p. 3225-3233, 2011.

KOPAN, R. Notch signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, p. 2012.

LAPOINTE, T.; BURET, A. Interleukin-18 facilitates neutrophil transmigration via myosin light chain kinase-dependent disruption of occludin, without altering epithelial permeability. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 302, p. 343-351, 2012.

LEE, S. Intestinal permeability regulation by tight junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. **Intestinal Research**, v. 13, p. 11-18, 2015.

LEI, S.; CHENG, T.; GOU, Y.; LI, C.; ZHANG, W.; ZHI, F. Somatostatin ameliorates lipopolysaccharide-induced tight junction damage via the ERK-MAPK pathway in Caco-2 cells. **European Journal of Cell Biology**, v. 93, p. 299-307, 2014

LEMGRUBER, L.; LUPETTI, P.; DE SOUZA, W.; VOMMARO, R. C. New details on the fine structure of the rhoptry of *Toxoplasma gondii*. **Microscopy Research and Technique**, v. 74, p. 812-818, 2011.

LIMA, W. R.; PARREIRA, K. S.; DEVUYST, O.; CAPLANUSI, A.; N'KULI, F.; MARIEN, B.; VAN DER SMISSEN, P.; ALVES, P. M.; VERROUST, P.; CHRISTENSEN, E. I.; TERZI, F.; MATTER, K.; BALDA, M. S.; PIERREUX, C. E.; COURTOY, P. J. ZONAB promotes proliferation and represses differentiation of the proximal tubule epithelial cells. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 21, p. 4778-488, 2010.

LYTTON, S.; FISCHER, W.; NAGEL, W.; HAAS, R.; BECK, F. Production of ammonium by *Helicobacter pylori* mediates occludin processing and disruption of tight junctions in Caco-2 cells. **Microbiology**, v. 151, p. 3267-3276, 2005.

MA, T.; BOIVIN, M.; YE, D.; PEDRAM, A.; SAID, H. Mechanism of TNF- $\alpha$  modulation of caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of the myosin light-chain kinase protein expression. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 288, p. 422-430, 2005.

MAILLOT, C.; GARGALA, G.; DELAUNAY, A.; DUCROTTE, P.; BRASSEUR, P.; BALLE, J. J.; FAVENNEC, L. *Cryptosporidium parvum* infection stimulates the secretion of TGF- $\beta$ , IL-8 and RANTES by Caco-2 cell line. **Parasitology Research**, v. 86, p. 947-949, 2000.

MATHERN, D.; LAITMAN, L.; HOVHANNISYAN, Z.; DUNKIN, D.; FARSIO, S.; MALIK, T.; RODA, G.; CHITRE, A.; IUGA, A.; YERETSSIAN, G.; BERIN, M.; DAHAN,

S. Mouse and human Notch-1 regulates mucosal immune responses. **Mucosal Immunology**, v. 7, p. 995-1005, 2014.

MCGUCKIN, M. A.; LINDEN, S. K.; SUTTON, P.; FLORIN, T. H. Mucin dynamics and enteric pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 265-278, 2011.

MENNECHET, F. J.; KASPER, L. H.; RACHINEL, N.; LI, W.; VANDEWALLE, A.; BUZONI-GATEL, D. Lamina propria CD4<sup>+</sup> T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 2988-2996, 2002.

MENNECHET, F. J.; KASPER, L. H.; RACHINEL, N.; MINNS, L. A.; LUANGSAY, S.; VANDEWALLE, A.; BUZONI-GATEL, D. Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4<sup>+</sup> T cells. **European Journal of Immunology**, v. 34, p. 1059-1067, 2004.

MILANO, J.; MCKAY, J.; DAGENAIS, C.; FOSTER-BROWN, L.; POGNAN, F.; GADIENT, R.; JACOBS, R. T.; ZACCO, A.; GREENBERG, B.; CIACCIO, P. J. Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. **Toxicological Sciences**, v. 82, p. 341-358, 2004.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 23-29, 2009.

MITTAL, V.; ICHHPUJANI, R. L. Toxoplasmosis - An update. **Tropical Parasitology**, v. 1, p. 9-14, 2011.

MIYAMOTO, S.; ROSENBERG, D. W. Role of Notch signaling in colon homeostasis and carcinogenesis. **Cancer Science**, v. 102, p. 1938-1942, 2011.

MIYAMOTO, A.; WEINMASTER, G. Notch Signal Transduction: Molecular and Cellular Mechanisms. In: Squire, Larry R. (Editor-in-Chief), **Encyclopedia of Neuroscience**. Oxford: Academic Press, p. 1259 – 1268, 2008.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.

MONTOYA, J. G.; ROSSO, F. Diagnosis and management of toxoplasmosis. **Clinics in Perinatology**, v. 32, p. 705-726, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOWAT, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 331-341, 2003.

NICHOLS, B. A.; CHIAPPINO, M.; O'CONNOR, G. R. Secretion from the rhoptries of the *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. **Journal of the Ultrastructure Research**, v. 83, p. 85-98, 1983.

NOAH, T. K.; SHROYER, N. F. Notch in the intestine: regulation of homeostasis and pathogenesis. **Annual Review of Physiology**, v. 75, p. 263-288, 2013.

ORTEGA-PACHECO, A.; ACOSTA VIANA, K. Y.; GUZMAN-MARIN, E.; SEGURA-CORREA, J. C.; ALVAREZ-FLEITES, M.; JIMENEZ-COELLO, M. Prevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* in fattening pigs farm from Yucatan, Mexico. **BioMed Research International**, v. 2013, Article ID: 231497, 2013.

PAREDES-SANTOS, T. C.; MARTINS-DUARTE, E. S.; VITOR, R. W.; DE SOUZA, W.; ATTÍAS, M.; VOMMARO, R. C. Spontaneous cystogenesis in vitro of a Brazilian strain of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology International**, v. 62, p. 181-188, 2013.

PELLEGRINET, L.; RODILLA, V.; LIU, Z.; CHEN, S.; KOCH, U.; ESPINOSA, L.; KAESTNER, K. H.; KOPAN, R.; LEWIS, J.; RADTKE, F. Dll1- and dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. **Gastroenterology**, v. 140, p. 1230-1240 e1231-1237, 2011.

PETERSON, L.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulator of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 141-153, 2014.

PINTO, M.; ROBINE-LEON, S.; APPAY, M.; KEDINGER, M.; TRIADOU, N.; DUSSAULX, E.; LACROIX, B.; SIMON-ASSMANN, P.; HAFFEN, K.; FOGH, J.; ZWEIBAUM, A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in Culture. **Biology of the Cell**, v. 47, p. 323-330, 1983.

POSSENTI, A.; FRATINI, F.; FANTOZZI, L.; POZIO, E.; DUBEY, J. P.; PONZI, M.; PIZZI, E.; SPANO, F. Global proteomic analysis of the oocyst/sporozyte of *Toxoplasma gondii* reveals commitment to a host-independent lifestyle. **BMC Genomics**, v. 14, doi:10.1186/1471-2164-14-183, 2013.

POWELL, D. W. Barrier function of epithelia. **The American Journal of Physiology**, v. 241, p. 275-288, 1981.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, p. 264-296, 2012.

SAI, Y.; KAJITA, M.; TAMAI, I.; WAKAMA, J.; WAKAMIYA, T.; TSUJI, A. Adsorptive-mediated endocytosis of a basic peptide in enterocyte-like Caco-2 cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 275, p. 514-520, 1998.

SATO, T.; VAN ES, J. H.; SNIPPET, H. J.; STANGE, D. E.; VRIES, R. G.; VAN DEN BORN, M.; BARKER, N.; SHROYER, N. F.; VAN DE WETERING, M.; CLEVERS, H. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. **Nature**, v. 469, p. 415-418, 2011.

SIBLEY, L.; AJIOKA, J. Population structure of *Toxoplasma gondii*: Clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 329-351, 2008.

SIBLEY, L.; KHAN, A.; AJIOKA, J.; ROSENTHAL, B. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 364, p. 2749-2761, 2009.

SCHNEEBERGER, E.; LYNCH, R. The tight junction: a multifunctional complex. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 286, p. 1213-1228, 2004.

SHEN, L. Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1258, p. 9-18, 2012.

STANGER, B. Z.; DATAR, R.; MURTAUGH, L. C.; MELTON, D. A. Direct regulation of intestinal fate by Notch. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 12443-12448, 2005.

SU, CH.; KHAN, A.; ZHOU, P.; MAJUMBAR, D.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.; ZHU, X.; AJIOKA, J.; ROSENTHAL, B.; DUBEY, J.; SIBLEY, L. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proceeding of the National Academy of Science**, v. 109, p. 5844-5849, 2012.

TAKASHIMA, S.; GOLD, D.; HARTENSTEIN, V. Stem cells and lineages of the intestine: a developmental and evolutionary perspective. **Development Genes and Evolution**, v. 223, p. 85-102, 2013.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217-1258, 2000.

TEO, C. F.; ZHOU, X. W.; BOGYO, M.; CARRUTHERS, V. B. Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 679-688, 2007.

TURNER, J. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 799-809, 2009.

TURNER, M.; LENHART, S.; ROSENTHAL, B.; ZHAO, X. Modeling effective transmission pathways and control of the world's most successful parasite. **Theoretical Population Biology**, v. 86, p. 50-61, 2013.

VAN DE WALLE, J.; HENDRICKX, A.; ROMIER, B.; LARONDELLE, Y.; SCHNEIDER, Y. Inflammatory parameters in Caco-2 cells: Effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 1441-1449, 2010.

VAN ES, J. H.; VAN GIJN, M. E.; RICCIO, O.; VAN DEN BORN, M.; VOOIJS, M.; BEGTHEL, H.; COZIJNSEN, M.; ROBINE, S.; WINTON, D. J.; RADTKE, F.; CLEVERS, H. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. **Nature**, v. 435, p. 959-963, 2005.



VANDUSSEN, K. L.; CARULLI, A. J.; KEELEY, T. M.; PATEL, S. R.; PUTHOFF, B. J.; MAGNESS, S. T.; TRAN, I. T.; MAILLARD, I.; SIEBEL, C.; KOLTERUD, A.; GROSSE, A. S.; GUMUCIO, D. L.; ERNST, S. A.; TSAI, Y. H.; DEMPSEY, P. J.; SAMUELSON, L. C. Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. **Development**, v. 139, p. 488-497, 2012.

WEBSTER, P.J. Review of ‘‘Toxoplasmosis of the Animals and Humans (Second Edition)’’ by J.P. Dubey. **Parasites & Vectors**, v. 3, doi:10.1186/1756-3305-3-112, 2010.

WEIGHT, C.; CARDING, S. The protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* targets the paracellular pathway to invade the intestinal epithelium. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1258, p. 135-142, 2012.

WEISS, L. M.; KIM, K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 391-405, 2011.

YANG, Q.; BERMINGHAM, N.; FINEGOLD, M.; ZOGHBI, H. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. **Science**, v. 7, p. 2155-2158, 2001

ZEROUNIAM, N.; LINDER, M. Effects of copper and ceruloplasmin on iron transport in the Caco-2 cell intestinal model. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 138-148, 2002.