

Organização estrutural do taquizoíta de *Toxoplasma gondii*

Structural organization of the tachyzoite of Toxoplasma gondii

Wanderley de Souza^{1,4}, Érica dos Santos Martins-Duarte^{2,4}, Leandro Lemgruber^{2,4},
Márcia Attias^{3,4}, Rossiane Claudia Vommaro^{3,4}

¹ Doutor em Ciências pelo Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Diretoria de Programa, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, Rio de Janeiro, Brasil.

² Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica) pelo Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

³ Doutor em Ciências pelo Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

⁴ Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

RESUMO

Objetivos: fazer uma revisão dos aspectos básicos da ultraestrutura do taquizoíta de *Toxoplasma gondii*, agente etiológico da toxoplasmose. **Fonte de dados:** os dados apresentados tomam como referência resultados recentes obtidos pelos principais grupos de pesquisadores no mundo, que se dedicam ao estudo do *Toxoplasma gondii*, incluindo-se dados do próprio grupo de autores. **Síntese dos dados:** os taquizoítos de *Toxoplasma gondii* são responsáveis pela fase aguda da infecção, penetrando ativamente, através do complexo apical, em células dos hospedeiros onde se multiplicam. São abordadas características ultraestruturais e moleculares particulares da película, do citoesqueleto, de organelas secretórias (róptrias, micronemas e grânulos densos) e não secretórias (apicoplasto) exclusivas do filo Apicomplexa, além das peculiaridades do núcleo, mitocôndria, acidocalcisomas, retículo endoplasmático e complexo de Golgi desses parasitos intracelulares. **Conclusões:** estas características confirmam que o sucesso nas etapas de adesão, invasão e multiplicação do parasito possui clara correlação com suas características morfofuncionais.

Descritores: *Toxoplasma gondii*/ultraestrutura; APICOMPLEXA; TOXOPLASMOSE; REAÇÃO DE FASE AGUDA; ANTICORPOS ANTIPROTOZOÁRIOS; ANTÍGENOS DE PROTOZOÁRIOS/imunologia.

ABSTRACT

Aims: To review basic aspects on the ultrastructure of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*, the causative agent of toxoplasmosis. **Source of data:** The data presented are based on recent publications by the most distinguished research groups in the area dedicated to the study of *Toxoplasma gondii*, including studies from the present authors. **Summary of findings:** The tachyzoites are responsible for the acute phase of the infection by actively penetrating, through the parasites' apical complex, the host cells where they multiply. Both ultrastructural and molecular particularities of the pellicle, the cytoskeleton, secretory (rhoptries, micronemas and dense granules) and non secretory (apicoplast) organelles, specific to Apicomplexa phylum, besides peculiar features of the nucleus, mitochondrion, acidocalcisomes, endoplasmic reticulum and Golgi complex of these intracellular parasites. **Conclusions:** These characteristics confirm that the success in the process of adhesion, invasion and multiplication of this parasite is clearly correlated to its morphology.

Keywords: *Toxoplasma gondii*/ultrastructure; APICOMPLEXA; TOXOPLASMOSIS; ACUTE-PHASE REACTION; ANTIBODIES, PROTOZOAN; ANTIGENS PROTOZOAN/immunology

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) é um patógeno intracelular obrigatório capaz de infectar e se replicar em qualquer célula nucleada de mamíferos e aves. É o agente etiológico da toxoplasmose, uma das infecções

parasitárias mais comuns ao homem e a outros animais homeotérmicos. Possui ampla distribuição, infectando cronicamente aproximadamente um terço da população mundial.¹ Na maioria dos adultos a toxoplasmose é assintomática, porém em alguns indivíduos pode causar cegueira e, em crianças congenitamente infectadas, retardo mental. Em indivíduos imunocomprometidos causa grande morbidade e mortalidade.² *T. gondii* foi primeiramente descrito em 1908 por Nicolle e Manceaux em um roedor encontrado na Tunísia, Norte da África, e por Splendore, no Brasil, em um coelho.^{3,4} O nome da espécie é originário do roedor

Endereço para correspondência/Corresponding Author:

WANDERLEY DE SOUZA
Instituto de Biofísica UFRJ
Av. Carlos Chagas Filho, 373 – Prédio do CCS – Bloco G sala 19
Cidade Universitária Ilha do Fundão
CEP 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
Tel./Fax: +55-21-2260-2364
E-mail: wsouza@biof.ufrj.br

Ctenodactylus gundi, do qual foi isolado; e o gênero é derivado do grego *toxon* (arco) e *plasma* (molde) devido ao seu formato encurvado e crescente. Pertence ao filo Apicomplexa, no qual estão incluídos diversos patógenos de importância médica e veterinária, como *Plasmodium* spp (agente causador da malária), *Cryptosporidium* spp (causador de diarréias graves em imunocomprometidos), *Eimeria* spp (causador da coccidiose em aves) e *Besnoitia* sp, *Babesia bovis* e *Theileria* spp (parasitos de gado). O filo Apicomplexa é caracterizado pela presença do complexo apical, composto de organelas secretórias especializadas, como rôptrias e micronemas, e de elementos do citoesqueleto, como os anéis polares e o conóide, este último apenas nos coccídeos, subclasse que inclui *T. gondii* (Figura 1).^{5,6}

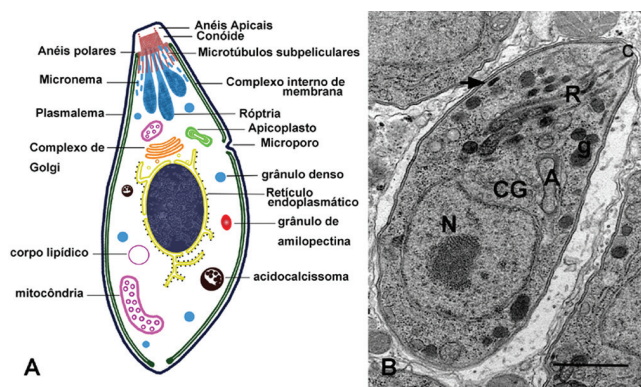


Figura 1. Morfologia geral da forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. (A) Representação esquemática. O esquema foi construído a partir de corte aleatórios do parasito observados em microscopia eletrônica de transmissão. (B) Corte longitudinal onde várias das estruturas representadas em (A) estão assinaladas: N - núcleo, c - conóide, R - rôptrias, A - apicoplasto, CG - Complexo de Golgi, g - grânulo denso, seta - micronema, VP - vacúolo parasitóforo. Barra: 1µm.

CICLO DE VIDA EM DOIS TIPOS DE HOSPEDEIROS

O ciclo de vida de *T. gondii* apresenta uma fase assexuada, que se passa na maioria dos animais, e uma fase sexuada, que se passa nos felídeos. Ao longo de todo o ciclo possui três formas infectivas: a taquizoíta (forma de multiplicação rápida da fase aguda), a bradizoíta (forma de multiplicação lenta, encontrada dentro de cistos tissulares) e a esporozoíta (forma encontrada nos oocistos).

O ciclo assexuado tem lugar nos inúmeros hospedeiros intermediários e consiste em dois estágios de vida distintos dependendo da fase da infecção: aguda ou crônica. A forma taquizoíta, objeto desta revisão, está presente nas manifestações clínicas da fase aguda da toxoplasmose. É decorrente da alta taxa de proliferação

dos taquizoítos com consequente ativação de uma forte resposta inflamatória pelo hospedeiro. A forma taquizoíta também é a responsável pela transmissão vertical para o feto via placenta.⁷ Sob pressão do sistema imunológico do hospedeiro, os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos, de multiplicação lenta e metabolismo baixo, que formam os cistos teciduais ou tissulares.⁸

O desenvolvimento de cistos tissulares em vários locais do corpo define a fase crônica do ciclo assexuado. São encontrados predominantemente no sistema nervoso central e nos tecidos musculares esquelético e cardíaco,⁹ onde podem permanecer pelo resto da vida do hospedeiro sem causar resposta inflamatória. Os cistos tissulares são a fase terminal do ciclo assexuado nos hospedeiros intermediários e uma fonte importante de contaminação do homem quando ingeridos na carne crua ou mal cozida de animais contaminados, uma vez que as formas bradizoítas são resistentes às enzimas presentes no suco gástrico.¹⁰

A fase sexuada ocorre apenas em felídeos, sendo o gato doméstico o hospedeiro mais importante, do ponto de vista epidemiológico, para a toxoplasmose humana. Na maioria das vezes esse ciclo tem início com a ingestão de cistos teciduais através do carnivorismo. Após a ingestão, vários ciclos, bastante complexos, sucedem-se até a geração de micro e macro gamontes, de cuja fusão resultam oocistos que serão eliminados com as fezes do hospedeiro e disseminados no ambiente, infectando mamíferos (inclusive o homem) e aves quando ingeridos através da água ou alimentos.¹¹ Estes liberam esporozoítas no aparelho digestivo que, então, infectam células epiteliais do intestino, dando origem aos taquizoítos da fase aguda da infecção.

ORGANIZAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DO TAQUIZOÍTO DE *Toxoplasma gondii*

O taquizoíta de *T. gondii* (Figura 1) é uma célula polarizada, de forma alongada, apresentando a região anterior afilada e a região posterior arredondada. Mede aproximadamente 8µm de comprimento por 2µm de largura. Na região anterior ou apical estão localizados os anéis polares, o conóide, as rôptrias e os micronemas, estruturas que formam o complexo apical. O núcleo situa-se na região mediana e acima deste dispõem-se o complexo de Golgi e o apicoplasto. Compondo o envoltório nuclear e ramificando-se pelo citossol, estão presentes elementos do retículo endoplasmático. A mitocôndria é única e ramificada. Os grânulos densos, acidocalcissomas e grânulos de amilopectina estão presentes em número e localização variáveis. O conjunto é envolvido pela película e, abaixo

desta, partindo do anel polar posterior, irradiam-se os microtúbulos subpeliculares que percorrem o corpo celular no eixo longitudinal até cerca de dois terços de sua extensão.

A PELÍCULA E SUA ASSOCIAÇÃO COM O CITOESQUELETO E A MOTILIDADE DO PARASITO

A associação da película com os elementos do citoesqueleto permite que *T. gondii* mantenha sua integridade mecânica e se locomova e infecte células ativamente, mesmo sem apresentar apêndices locomotores como cílios, flagelos ou a emissão de pseudópodos.

A película, estrutura trimembranar que envolve o taquizoíto, é formada pela membrana plasmática e pelo complexo membranar interno. Este é formado pela associação íntima de longas cisternas achatadas, interrompidas em vários pontos de sua superfície. Cortes transversais a esta película, observados ao microscópio eletrônico de transmissão, mostram a presença de duas unidades de membrana justapostas formando o complexo.¹² A membrana plasmática é contínua, porém o complexo interno é interrompido logo abaixo dos anéis polares do conóide (na extremidade posterior) e na região do microporo – formado pela invaginação da membrana plasmática e que parece estar envolvido na ingestão de macromoléculas através de um processo endocítico (Figura 2 – inserto).¹³ Réplicas de criofratura mostraram a distribuição de partículas intramembranas (proteínas transmembrana) em arranjos lineares coincidentes com a distribuição dos microtúbulos subpeliculares, evidenciando uma íntima associação entre a película e o citoesqueleto.¹²

CITOESQUELETO

A observação por microscopia eletrônica de transmissão de taquizoítos previamente tratados com detergentes e soluções hipotônicas e contrastados negativamente revela que um arcabouço de microtúbulos confere integridade estrutural ao parasito. Partindo da região apical extrema do protozoário encontramos dois anéis apicais logo abaixo da membrana plasmática, de composição molecular ainda desconhecida. O superior mede 160nm de diâmetro, enquanto que o inferior 200nm. Abaixo destes, encontramos um anel polar também de natureza molecular ainda desconhecida, onde está o centro organizador de microtúbulos,^{6,14} de onde partem 22 microtúbulos subpeliculares, compostos de 13 protofilamentos cada. Estes distribuem-se de modo equidistante na periferia e se estendem por dois terços do corpo do parasito (Figuras 3 e 4).¹⁵

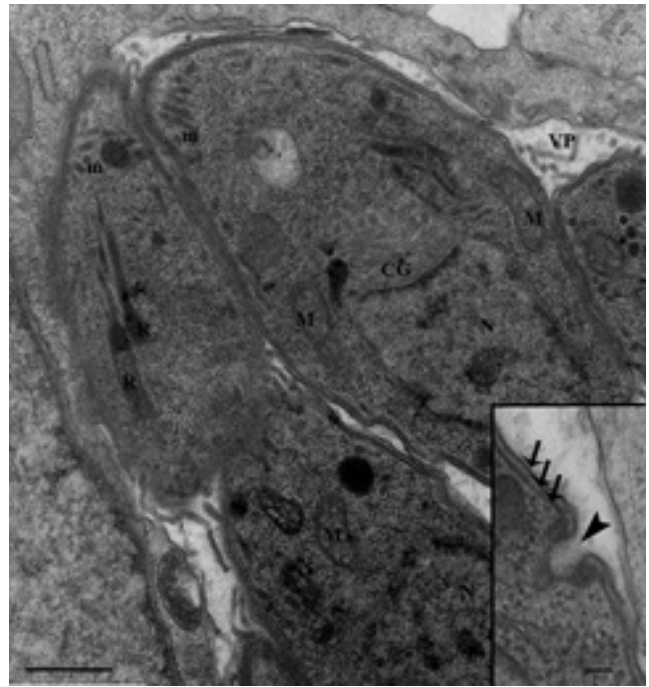


Figura 2. Corte longitudinal de um vacúolo parasitóforo (VP) mostrando perfis de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, onde se observam as organelas secretórias rôptrias (R) e micronemas (m), além do complexo de Golgi (CG), mitocôndria (M) e núcleo (N). No inserto, grande aumento mostrando as três membranas que compõem a película (setas) e o microporo (cabeça de seta). Barras: 1µm. (Foto do acervo dos autores, publicada anteriormente na *Revista do Instituto de Medicina Tropical de S. Paulo*, reproduzida com permissão.)

Além desses 22 microtúbulos, dois microtúbulos de aproximadamente 400nm de comprimento percorrem o eixo central do protozoário (Figura 3A – inserto) passando por dentro do conóide. Na altura dos anéis polares situa-se uma estrutura cilíndrica e oca, o conóide, de aproximadamente 400nm de diâmetro e 250nm de comprimento. Este também é formado por tubulina, mas polimerizada em uma conformação única que resulta em fibrilas em forma de vírgula compostas por nove protofilamentos, justapostas em arranjo espiralado.¹⁶

Tanto na observação de parasitos vivos ao microscópio óptico, quanto em cortes ultrafinos e, mesmo, em microscopia eletrônica de varredura, observa-se que o conóide é uma estrutura móvel, que se desloca acima e abaixo do anel polar posterior (Figura 3A – inserto e Figura 4), após estímulos que disparam o influxo de cálcio, como a ionomicina. O tratamento com citocalasina D, em contrapartida, inibe a extrusão dessa estrutura.¹⁷ Entretanto, até o momento, não foi possível associar esse movimento de extrusão ao fenômeno de secreção de rôptrias e micronemas que ocorre durante a invasão da célula hospedeira.

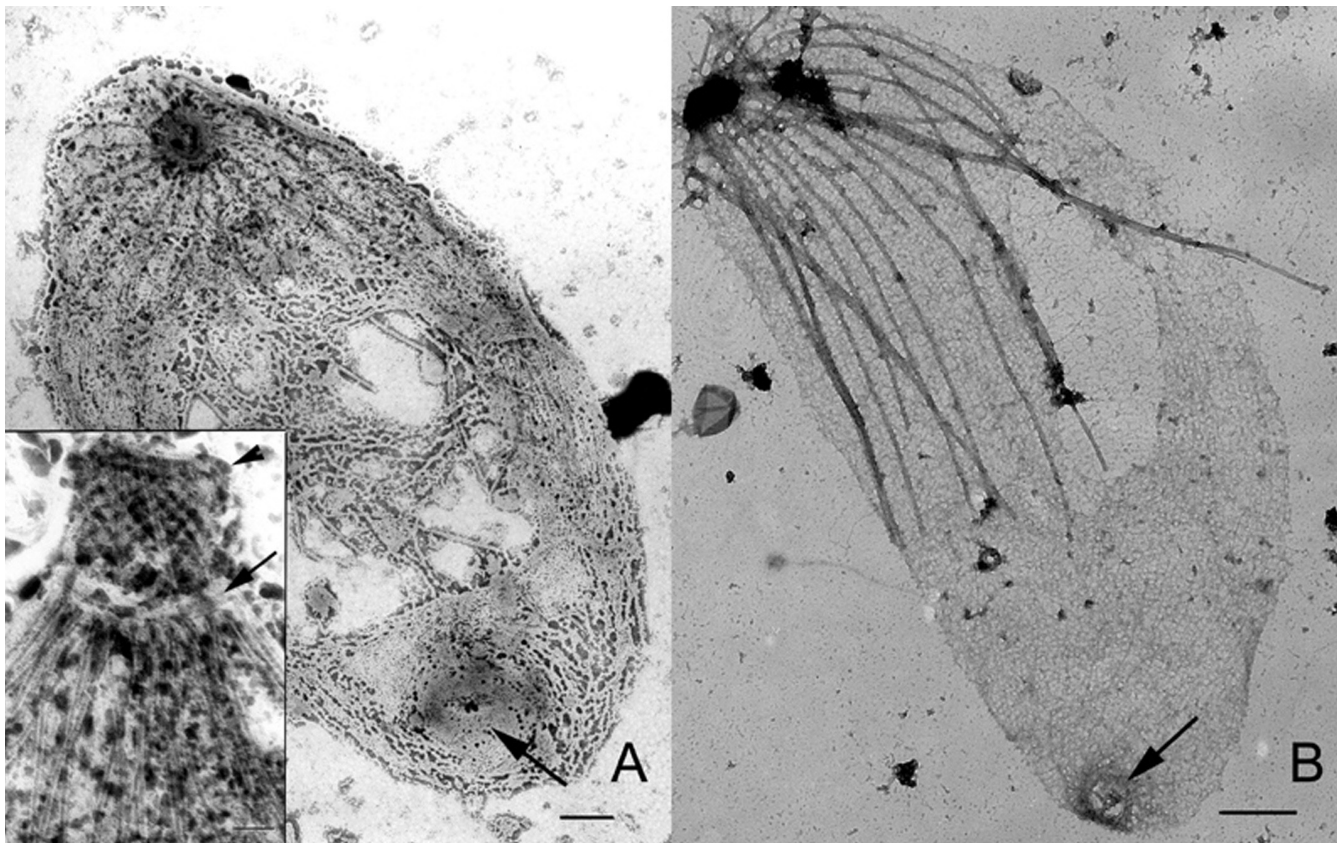


Figura 3. Contrastação negativa de *Toxoplasma gondii*. **(A)** Extração da película com detergentes revela a estrutura do citoesqueleto com microtúbulos subpelviculares distribuindo-se radialmente a partir do anel polar, no centro do qual observa-se o conóide. No inserto, maior aumento da região apical onde se observa a disposição em espiral das fibras do conóide, além do anel apical (cabeça de seta) e o anel polar (seta). **(B)** Além dos microtúbulos, o citoesqueleto também compreende uma rede subpelvicular que se estende até a porção posterior do parasito e termina numa estrutura circular de maior densidade, que também é visível na **A** (setas). Barras: 0,5μm. Inseto: 200nm. (Foto do acervo dos autores, publicada anteriormente no periódico *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, reproduzida com permissão.)

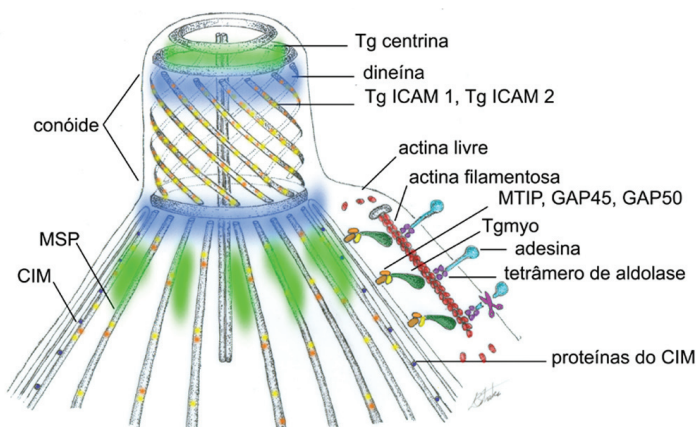


Figura 4. Esquema da porção anterior de um taquizoíto de *Toxoplasma gondii* reunindo o conhecimento atual sobre a organização estrutural e molecular do citoesqueleto. A presença de Tg centrina, ICAM 1 e 2 foi confirmada, entretanto sua interação estrutural com outros componentes do citoesqueleto ainda não foi determinada. Tg centrina está presente na região dos anéis polares apicais e em pontos distribuídos abaixo do anel polar (regiões sombreadas), enquanto a marcação para dineína foi positiva tanto no topo quanto na base do conóide. ICAM 1 e 2 se dispõem em

consonância com as fibras espiraladas do conóide e ao longo dos microtúbulos subpelviculares (MSP). As moléculas envolvidas no deslizamento (*gliding*) estão representadas à direita do leitor, onde a escala real entre a membrana plasmática e o Complexo Interno de Membranas (CIM) foi desconsiderada para permitir a representação das diversas moléculas já identificadas. (Modificado a partir de Attias M. e De Souza W., em “Trends in Cell & Molecular Biology”.)

REDE SUBPELICULAR

Além dos microtúbulos subpeliculares, situa-se abaixo do complexo membranar interno a rede subpelicular, composta por filamentos de 8-10nm de espessura interconectados.^{6, 18-19} As proteínas que compõem essa rede, TgIMC 1 e 2, são similares às articulinas encontradas em *Euglena*, assim como outra identificada por Lemgruber et al., de 42% de identidade e 55% de similaridade com ariculinas de *Euglena gracilis*.¹⁹

Essa rede estende-se homogeneamente por todo corpo do parasito, terminando em uma estrutura circular na extremidade posterior (Figura 3), recentemente denominada complexo basal, e contém proteínas caracterizadas como TgMORN1, TgCentrin 2 e a cadeia leve da dineína.²⁰

ACTINA, MIOSINA E A MOTILIDADE

Embora não possua uma estrutura envolvida na locomoção, como *pili*, flagelo ou cílios, *T. gondii* possui uma maquinaria motora embebida entre a membrana plasmática e o complexo interno de membrana, que permite a geração de força entre componentes do citoesqueleto e substratos extracelulares, ocasionando o mecanismo de deslizamento (*gliding*). Em poucas palavras, este supõe a adesão do parasito ao substrato (por exemplo matriz extracelular, membrana das células hospedeiras) através de proteínas transmembrana semelhantes à trombospondina (TRAP), que se localizam internamente nos micronemas, em *T. gondii* denominada MIC2. A MIC2, por sua porção citoplasmática associa-se a filamentos curtos e muito dinâmicos de actina e estes, por sua vez, à TgMyo, um tipo de miosina exclusivo do *Toxoplasma* da classe XIV (MyoA), miosina de cadeia leve (MLC1) e duas proteínas associadas a esta maquinaria – GAP45 e GAP50. Esta última é uma proteína integral de membrana, ancorada em sítios ricos em colesterol no complexo membranar interno e é responsável pelo ancoramento desse complexo proteico,²¹ denominado “glideosome”, a essa membrana.²² Por fim, a porção N-terminal das MIC se conecta a filamentos de F-actina do parasito através de uma proteína, a aldolase (Figura 4).^{23,24} O resultado das forças de adesão da MIC 2, tração da TgMYO, fluxo de membranas no sentido anteroposterior e ancoragem do conjunto aos microtúbulos subpeliculares e à rede subpelicular, corresponde ao deslizamento observado ao microscópio óptico.²⁵ Ultraestruturalmente, a presença de actina e miosina foi detectada inicialmente por imunofluorescência.²⁶ Filamentos de actina foram observados por microscopia eletrônica de transmissão

com o uso de jasplakinolida, droga que induz a polimerização dos mesmos.²⁷ Sem o uso de drogas, a visualização de filamentos de actina em microscopia eletrônica de transmissão não foi possível até o momento.

ORGANELAS SECRETÓRIAS ESTÃO ENVOLVIDAS COM A ENTRADA ATIVA E COM O ESTABELECIMENTO DO VACÚOLO PARASITÓFORO

Certamente o que há de mais característico em *T. gondii* é o seu complexo apical formado pelo conóide e por organelas secretórias especializadas, as róptrias e os micronemas.

Micronemas

Os micronemas são pequenas estruturas em forma de bastão de aproximadamente 50nm × 250nm, que só são encontradas na extremidade anterior do protozoário (Figuras 1 e 2). São limitados por uma unidade de membrana e apresentam um conteúdo homogêneo e eletrondenso. Esse conteúdo é fortemente marcado quando se utiliza a técnica do ácido fosfotúngstico alcoólico, que detecta proteínas básicas. Os micronemas contém um grande número de proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático e que apresentam na porção N-terminal uma sequência de aminoácidos que as direcionam para esta organela. Essas proteínas passam pelo complexo de Golgi e são glicosiladas. Elas são designadas como MIC 1, 2 e assim sucessivamente, sendo que até o momento 11 proteínas já foram identificadas.²⁸ Proteínas do micronema contém variedade de domínios adesivos, incluindo as proteínas tipo integrinas (MIC2), as tipo trombospondina (MIC 1 e 2), as tipo EGF (fator de crescimento epidermal) (MIC 6, 7, 8 e 9) e as tipo lectinas (MIC3 e MIC 8), que medeiam interações com componentes da superfície da célula hospedeira. Algumas dessas proteínas estão envolvidas no processo de adesão do protozoário à superfície da célula hospedeira, funcionando como adesinas. O conteúdo dos micronemas é liberado nos momentos iniciais da interação com a célula hospedeira, em um processo regulado por Ca²⁺.²⁹ AMA 1 (antígeno de membrana apical) é uma outra importante proteína de micronema, secretada nos momentos iniciais da entrada do parasito na célula hospedeira e que participa da formação da junção móvel. Junção do tipo ocludente em forma de anel, que se forma entre as membranas do parasito e da célula hospedeira no momento da entrada ativa.

Róptrias

As róptrias são organelas maiores que os micronemas e em formato de clava, apresentando a região basal mais larga, com uma matriz com aspecto esponjoso, e uma porção mais afilada, voltada para a extremidade apical, conhecida como pescoço da organela (Figuras 1 e 2). Taquizoítos de *T. gondii* apresentam cerca de oito róptrias. Esta organela é delimitada por uma unidade de membrana, possui pH ácido e também contém proteínas básicas. Essas proteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático e apresentam peptídeos sinal, em geral uma sequência YXXfi e LL, passando pelo complexo de Golgi e posteriormente acumulando-se nas róptrias. Pelo menos 29 proteínas já tiveram sua localização confirmada nas róptrias.³⁰ Dentre estas, 24 estão localizadas na porção basal (bulbo), sendo denominadas ROPs, e 5 estão presentes no pescoço, sendo denominadas RONS.

A secreção do conteúdo dessas organelas parece ser sequencial à secreção das moléculas dos micronemas, mas ainda assim bem inicial no processo de invasão do parasito. Essa secreção consiste de ROP1, ROP2/3/4 e ROP18, em conjunto com a proteína de grânulo denso, GRA7, abordada abaixo.³⁰ Todas estas moléculas são encontradas em pequenas vesículas ou em esferas tipo vesículas, alinhadas em fileiras dentro do citoplasma e do núcleo da célula antes da invasão parasitária e também após a invasão no vácuolo parasitóforo. A maioria dessas proteínas foi descoberta com o auxílio da proteômica de róptrias purificadas. Algumas delas têm seu conteúdo secretado durante o processo inicial de invasão celular, logo após a secreção dos micronemas.^{30,31}

Grânulos densos

Enquanto os micronemas e as róptrias secretam seus conteúdos durante os processos de adesão e invasão, um outro tipo de organela secretória, os grânulos densos secretam seu conteúdo majoritariamente na fase intracelular do ciclo. Os grânulos densos são organelas esféricas, distribuídas por todo o corpo do parasito, e têm diâmetro médio de 0,2µm (Figura 1). A matriz da organela é uniformemente eletrondensa devido à grande concentração de proteínas. Estudos da cinética de infecção por *T. gondii* em células hospedeiras demonstraram que o conteúdo dos grânulos densos é secretado após o término do processo de entrada e se localiza nos limites do vacúolo parasitóforo (VP). Ao contrário de róptrias e micronemas, que secretam seu conteúdo na região apical do parasito, a secreção dos grânulos densos ocorre majoritariamente nas regiões lateral e posterior do corpo do parasito. Uma vez

secretadas, as GRAs (proteínas localizadas em grânulos densos) são encontradas na membrana do VP e na rede intravacuolar, composta de nanotúbulos de 60-90 nm de diâmetro.³² Enquanto GRA3, GRA5, GRA7, and GRA8 são incorporadas à membrana do VP, GRA2, GRA4, and GRA6 formam um complexo que interage e estabiliza as membranas da rede intravacuolar.³²⁻³³

Endomembranas

A rede endomembranar de *T. gondii* é composta por um único retículo endoplasmático (RE) e um único complexo de Golgi (Figura 2).³⁴ O RE está localizado principalmente na área perinuclear, como parte do envoltório nuclear, que é um compartimento intermediário obrigatório para a translocação entre o RE e o Golgi.³⁵ O complexo de Golgi é formado por três a cinco cisternas localizadas na região anterior ao envoltório nuclear, adjacente ao RE.³⁶ Em *T. gondii* os centrosomos estão associados ao complexo de Golgi nos diferentes estágios do ciclo celular.³⁷

A existência de um sistema lisossomal não está estabelecida, já que até o momento não foi identificado equivalente morfológico de lisossomas secundários em *T. gondii*.³⁸ No entanto, algumas características das róptrias, tais como seu pH ácido e a presença de cisteína e serina proteases,³⁸⁻⁴⁰ sugerem que essas organelas sejam equivalentes aos lisossomas.⁴¹ Outra organela ausente em *T. gondii* é o peroxissomo.⁴²

Mitocôndria

Enquanto a maioria dos organismos pluricelulares possui um grande número de mitocôndrias, *T. gondii* possui apenas uma mitocôndria, longa e ramificada, conforme demonstrado tanto por imunohistoquímica quanto por reconstrução tridimensional.^{43,44} Em cortes ultrafinos observa-se que a membrana interna da mitocôndria única de *T. gondii* possui um grande número de cristas tubulares que sofrem uma leve constrição na região de fusão à membrana interna (Figura 5).^{43,44} O genoma mitocondrial dos Apicomplexa é o menor já descrito: 6kb.

A mitocôndria em *T. gondii* pode ser corada com rodamina 123, demonstrando possuir um potencial de membrana ativo.⁴⁵ Estudos bioquímicos com taquizoítos extracelulares mostraram o consumo de oxigênio na presença de diversos substratos e sua redução na presença de inibidores mitocondriais clássicos.⁴⁶ A participação da mitocôndria como geradora de energia para o parasito, no entanto, é controversa e ainda está sob investigação. Embora os taquizoítos possuam mitocôndrias com cristas tipicamente associadas com a respiração, sua produção de energia depende fortemente da glicólise.^{47,48}

Além das atividades de fosforilação oxidativa, a mitocôndria de *T. gondii* também estaria envolvida na formação de complexos Fe-S, biossíntese de heme e pirimidina.^{49,50}

Apicoplasto

Além da mitocôndria, os Apicomplexa em geral e o *T. gondii* entre eles possuem uma outra organela de origem endossimbiótica secundária: o apicoplasto.^{51,52} O apicoplasto é uma organela envolta por quatro membranas e localizada na região anterior ao núcleo e adjacente ao complexo de Golgi (Figura 5). Embora esta organela tenha sido identificada morfológicamente desde a década de 1960, apenas recentemente descobriu-se tratar-se de um plastídeo.⁵¹ A sua delimitação por múltiplas membranas poderia fornecer a primeira pista sobre sua origem, mas este detalhe passou despercebido por décadas. Somente na década de 1980, estudos com o DNA extracromossomal do *Plasmodium knowlesi* forneceram outras pistas sobre sua natureza. Além do DNA nuclear, foram encontrados outros dois, possuindo 35kb e 6kb.^{53,54}

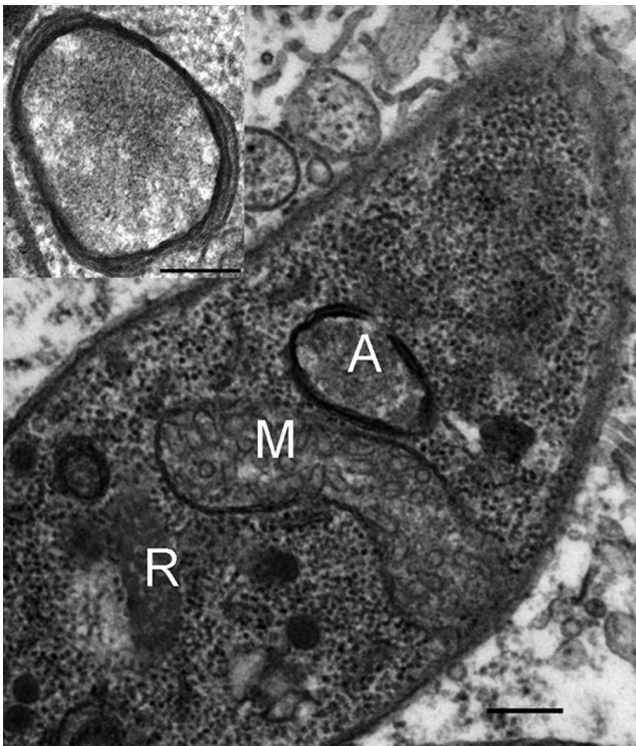


Figura 5. Micrografia eletrônica de um corte ultrafino de taquizoíto de *Toxoplasma gondii* evidenciando a estrutura da mitocôndria (M) com cristas típicas (bulbosas), rópria (R) e o apicoplasto (A). No inserto, as quatro membranas que envolvem o apicoplasto podem ser distinguidas. Barras: 250nm. Inserto: 200nm.

A análise do DNA de 35kb revelou que este contém RNA polimerase semelhante à de cianobactérias, o que sem dúvida é uma característica de plastídeos.⁵⁴ O genoma do plastídeo de *T. gondii* foi sequenciado por volta de 1997 (GenBank accession U87145) e demonstrou ser similar tanto em organização quanto em conteúdo gênico ao encontrado em *P. falciparum* e em outras espécies de Apicomplexa, o que faz de *T. gondii* um excelente modelo para o estudo do plastídeo de Apicomplexa.⁵⁵ No entanto, a localização subcelular desse genoma ainda permanecia um mistério, até que estudos de hibridização *in situ* usando sondas em *T. gondii* mostraram que o genoma de 35kb residia em uma organela localizada na região apical ao núcleo, a até então misteriosa organela multimembranar, denominada, a partir de então, apicoplasto.^{51, 56}

Numerosas micrografias eletrônicas mostram a presença de quatro membranas ao redor do apicoplasto,⁵¹ de forma que as duas membranas internas seriam do cloroplasto original, a terceira membrana representaria a membrana externa da alga vermelha, e a mais externa derivada do ancestral Apicomplexa (Figura 5 – inserto).⁵⁷ A presença de translocadores da membrana externa (TOC) e interna (TIC) do cloroplasto como facilitadores do transporte através das membranas mais internas tem sido especulada.⁵⁸ A presença de TOC em *T. gondii* ou qualquer outro parasito não foi identificada, mas recentemente a presença de um homólogo de TIC foi identificada na membrana mais interna do apicoplasto em *T. gondii*.⁵⁹

Além das funções essenciais para sua manutenção, como síntese de DNA e proteínas, no apicoplasto também ocorrem vias metabólicas importantes, como a biossíntese de ácidos graxos do tipo II, a síntese de isoprenoides, cujas enzimas são distintas da via do mevalonato encontrada em humanos, vias acessórias como sistema redox compreendida por ferredoxina-NADP⁺ redutase e ferredoxina, ácido lipóico sintetase, síntese de agregados de Fe-S e algumas etapas da biossíntese do grupamento heme.^{49, 60-64}

Acidocalcissomos e corpos lipídicos

T. gondii ainda apresenta outras organelas importantes, como os acidocalcissomos e os corpos lipídicos. Os acidocalcissomos são envoltos por uma única unidade de membrana, ocorrendo em número de 10 com diâmetro que varia de 150 a 40nm e se encontram dispersos aleatoriamente no citoplasma do parasito (Figura 6). Ao serem incubadas com laranja de acridina (uma base fraca, fluorescente, que se acumula em compartimentos ácidos) essas estruturas aparecem em cor laranja, quando visualizados por microscopia

de fluorescência, mostrando possuir natureza acídica. Os acidocalcissomos são facilmente identificados através da microanálise de raio-X na microscopia eletrônica. Essas organelas apresentam, além de cálcio, pirofosfato, polifosfato, magnésio, oxigênio, potássio, cloro e zinco. Os acidocalcissomos possuem uma Ca^{2+} -ATPase do tipo de membrana envolvida com influxo de Ca^{2+} e duas bombas de prótons – uma H^{+} -ATPase vacuolar e H^{+} -pirofosfatase vacuolar, que atuam na acidificação deste compartimento.⁶⁵

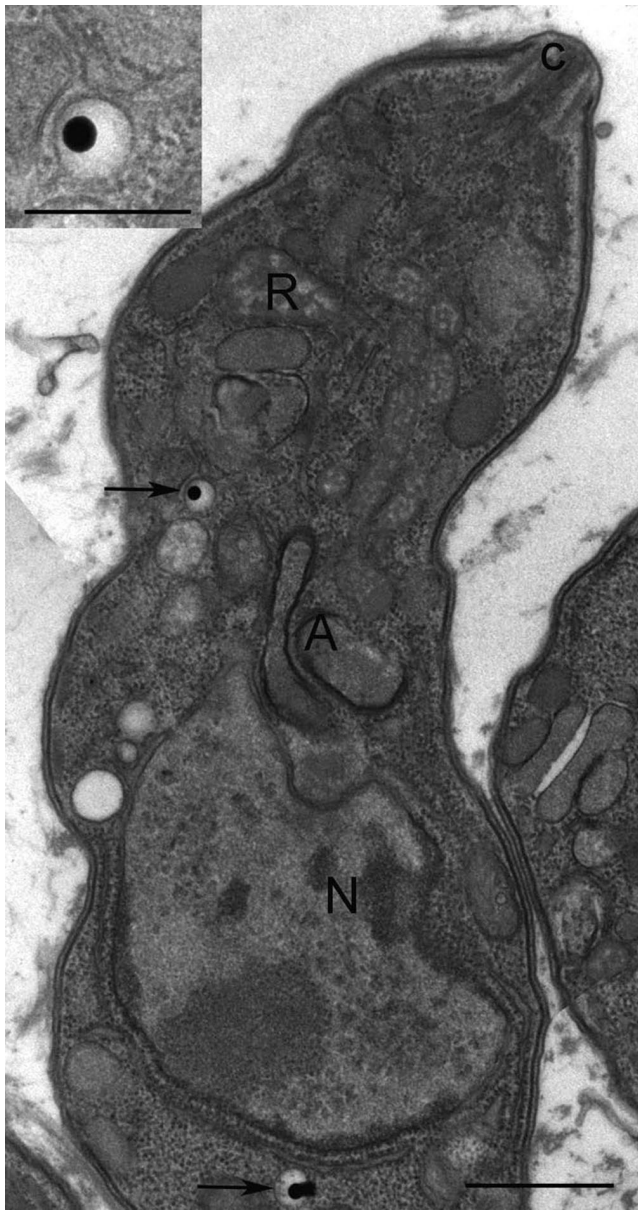


Figura 6. Corte longitudinal de um taquizoito intracelular de *Toxoplasma gondii*, destacando dois acidocalcissomos com as inclusões eletrondensas típicas apontadas por setas. Conóide (c), róptria (R), apicoplasto (A), núcleo (N). Inseto: maior aumento de um dos acidocalcissomos. Barras: 500nm, inseto-200nm.

Os corpos lipídicos são gerados como parte do metabolismo geral do protozoário e podem representar uma forma de material de reserva a ser utilizada posteriormente.⁶⁶ Estudos mostraram que a atividade de enzimas envolvidas na síntese de lipídios de reserva como triacilgliceróis e ésteres de colesterol estão relacionados com a síntese de corpos lipídicos em *T. gondii*.^{67, 68}

FORMAÇÃO DO VACÚOLO PARASITÓFORO E PARTICIPAÇÃO DAS ORGANELAS SECRETORAS

O processo de invasão tem início quando o taquizoito entra em contato com a superfície da célula hospedeira. Normalmente ocorre uma reorientação do parasito, posicionando-se perpendicularmente à superfície celular através do seu polo apical.⁶⁹ Aparentemente, o *T. gondii* não tem preferências para se ligar a nenhum subdomínio presente na membrana da célula hospedeira e nem há a transferência de moléculas desses domínios para a membrana do VP que se forma.⁷⁰ Isto provavelmente está ligado ao ciclo de vida do protozoário. Como ele é capaz de infectar diferentes tipos celulares, sem ter subdomínios para se ligar a uma célula, ele pode utilizar receptores e ligantes comuns a todas as células para se ligar à membrana plasmática.

No momento da adesão do taquizoito à superfície da célula hospedeira, há secreção das proteínas dos micronemas e róptrias.⁶⁹ Enquanto ocorre a internalização do parasito, forma-se uma estrutura transitória, a junção móvel.⁷¹ Alexander et al.⁷² demonstraram que esta seria formada por um complexo protéico de diferentes organelas. Esses autores identificaram nesta estrutura as proteínas AMA 1 (ancorada por GPI e secretada pelos micronemas) e as RON 2, 4 e 5 (presentes no pescoço das róptrias e secretadas durante a invasão).⁷² Ao formar essa junção transitória, o parasito sofre uma constrição, deformando seu corpo. Ele suportaria esta constrição graças à associação dos microtúbulos subpelviculares, rede subpelvicular e complexo intramembranar, como mencionado anteriormente.

Enquanto o parasito invade a célula, ocorre a formação do VP. Esse vacúolo tem características não fusogênicas, evitando a fusão com os elementos das vias endo e exocíticas da célula hospedeira e escapando, assim, de uma fusão com os lisossomos.⁷³ As róptrias, no momento da adesão e após a invasão, secretam seus conteúdos na célula hospedeira através de vesículas que irão se fundir com a membrana do vacúolo.⁷⁴ Essas vesículas contêm, além de proteínas (as ROPs), estruturas membranares que irão fazer

parte da membrana vacuolar. Já foi demonstrado que há necessidade do colesterol da célula hospedeira para que o conteúdo dessas organelas seja secretado e ocorra a formação do VP.⁷⁵ A membrana do vacúolo é formada majoritariamente por lipídios da membrana plasmática da célula hospedeira: somente 20% dos lipídios são secretados pelo próprio parasito.⁷⁶

Durante o estabelecimento da infecção ocorre um remodelamento das estruturas da célula hospedeira ao redor do VP. ROP2, que é uma proteína transmembranar que expõe sua porção N-terminal no citoplasma da célula hospedeira, apresenta uma sequência de aminoácidos que se assemelha ao sinal de importação mitocondrial.^{77,78} Assim, esta porção da ROP2 é inserida na membrana externa mitocondrial (demonstrado com mitocôndrias *ex vivo*), promovendo a associação da membrana do VP com a mitocôndria. A associação com a mitocôndria, além da ligação com o retículo endoplasmático (por um mecanismo ainda não definido) facilitaria a aquisição de lipídeos pelo parasito.⁷⁹

Halonen e Weidner⁸⁰ mostraram que, em astrócitos *in vitro*, além dessas duas organelas (mitocôndria e retículo endoplasmático), o VP também seria circundado por filamentos intermediários. Esses autores acreditam que este fato facilitaria a localização do VP perto do núcleo celular, favorecendo a interceptação de purinas pelo parasito, já que ele não é capaz de realizar a síntese *de novo* de purinas.⁸⁰

Lemgruber et al.⁸¹ mostraram através da técnica de criofratura que, após a entrada de *T. gondii*, a membrana do VP apresenta densidade de proteínas intramembranas de aproximadamente 300 partículas/ μm^2 e, após o primeiro ciclo de replicação, quatro vezes este número, que permanece constante até o final do ciclo celular, apesar do aumento do volume da estrutura.⁸¹ Schwab et al.⁸² observaram que moléculas de até 1300Da teriam livre passagem entre o citoplasma da célula hospedeira e a matriz do VP. Assim, sugeriram que proteínas presentes na membrana do VP estariam associadas umas às outras, formando poros, os quais permitiriam o tráfego de solutos de baixo peso molecular, que o parasito poderia usar no seu metabolismo.⁸²

A REDE INTRAVACUOLAR

O VP propicia um ambiente favorável à sobrevivência e multiplicação de *T. gondii*, incluindo a rede intravacuolar, uma intrincada rede de túbulos limitados por unidade de membrana, resultado de secreção dos grânulos densos. De diâmetro uniforme de cerca de 30nm, os túbulos podem se bifurcar ou

não (Figura 7). Já foi observada a fusão entre os túbulos e a membrana do VP, mas não entre o túbulo e a membrana do parasito.^{83,84} Com relação à função dessa rede, aventou-se que poderia servir como rede de captação de nutrientes do citossol para o vacúolo. Entretanto, uma vez que a membrana do vacúolo é permeável a moléculas de até 1.300Da,⁸² a função mais razoável dessa rede, conforme observado por Magno et al.,⁸⁴ seria a de sustentação e organização da roseta de parasitos à medida que se sucedem os ciclos endodiológicos.

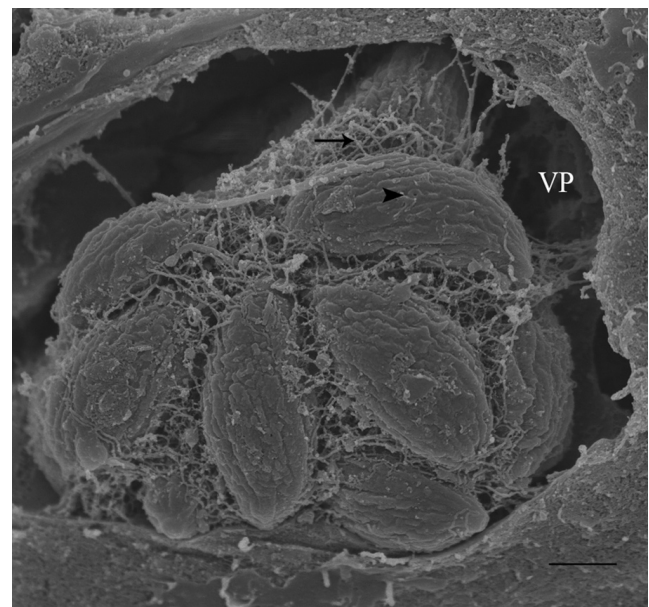


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução onde se observa no interior de um vacúolo parasitóforo (VP) a conformação em roseta dos taquizoítos após sucessivos ciclos de divisão endodiológica. Uma rede de nanotúbulos (seta) contribui na estabilidade do conjunto. Cabeça de seta: microporo de um taquizoíto. Barra: 1 μm .

MUDANÇAS ESTRUTURAIS DO TAQUIZOÍTO DURANTE O PROCESSO DE ENDODIOGENIA

Uma vez estabelecida a infecção na célula hospedeira, *T. gondii* inicia um processo de divisão chamado de endodiológia. A endodiológia é uma forma especializada de reprodução na qual duas células filhas são formadas no interior de uma célula mãe, que se degenera ao fim do processo.⁸⁵ Esta forma de divisão exclusiva ocorre durante a formação de taquizoítos e bradizoítos, e difere do processo que ocorre nos enterócitos do hospedeiro definitivo ou no interior do oocisto.

O início da endodiogenia é marcado pelo alongamento do complexo de Golgi e do apicoplasto, seguida da divisão do centrosomo na porção posterior ao núcleo e do complexo de Golgi. Em seguida, ocorre o aparecimento de dois novos complexos apicais rudimentares, consistindo de conóide, anéis apicais e anel polar posterior, que irão nuclear os microtúbulos subpeliculares e o complexo interno de membrana.⁸⁶ Essas estruturas membranares começam a definir as células filhas dentro do citoplasma da célula mãe. Conforme as células filhas se estendem, os núcleos finalizam a replicação do seu DNA e assumem um formato lobular, semelhante a uma ferradura, onde a cromatina se distribui de maneira equivalente em direção aos pólos opostos para formar o fuso intranuclear (Figura 8). Em *T. gondii* a divisão nuclear ocorre por uma endomitose fechada, ou seja, o envelope nuclear permanece intacto.

À medida que o complexo interno de membranas associado aos microtúbulos estende-se, engloba primeiramente os centrosomos e o Golgi, seguidos pelo apicoplasto, núcleo e RE já divididos. A partir deste ponto a célula mãe torna-se mais esférica e um novo conjunto de organelas apicais (róptrias e micronemas) é formado nos dois polos anteriores das células filhas nascentes (Figura 8). A participação de proteínas relacionadas à dinamina foi recentemente descrita como essencial para a divisão do apicoplasto e a síntese *de novo* de organelas secretórias (róptrias e micronemas) durante o processo de divisão.^{87, 88}

A mitocôndria é a última organela a ser incorporada durante esse processo. A replicação tanto do apicoplasto quanto da mitocôndria é dependente da divisão celular, ao contrário de outros eucariotos onde a replicação de organelas de origem endossimbiótica é autônoma. Cada célula filha continua sua maturação até que o citoplasma e todo o seu conteúdo estejam divididos entre as duas proles. Eventualmente, o complexo interno de membrana da mãe desaparece e a membrana plasmática original é usada para envolver as duas células jovens. Uma clivagem iniciada no pólo anterior estende-se através das células filhas e durante esse processo a formação da membrana plasmática das células filhas ocorre através da fusão de novas membranas provenientes do tráfico vesicular mediado por Rab-11.⁸⁹ Ao fim desse processo, restarão duas células filhas e um corpo residual na extremidade posterior (Figura 8B).

Os parasitos resultantes das divisões celulares organizam-se na forma de rosetas dentro do VP e, após sucessivas multiplicações, atravessam ativamente a membrana do vacúolo e da célula hospedeira, que acaba por romper-se, liberando novos taquizoítos capazes de infectar outras células.

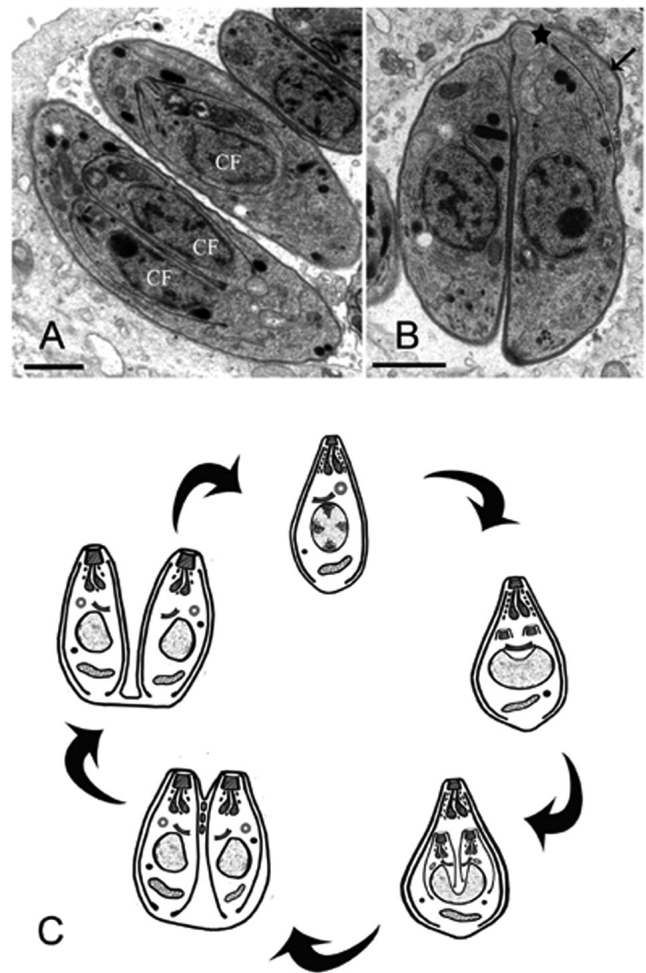


Figura 8. Etapas da endodiogenia observadas ao microscópio eletrônico de transmissão. (A) Dois taquizoítos em processo de endodiogenia. Apenas no mais inferior observam-se os perfis das duas células filhas (CF). No que se encontra acima deste, apenas uma das células filhas é observada. (B) Final do processo de endodiogenia onde se observam apenas as células filhas. Remanescentes da película mais externa da célula mãe estão assinalados pela seta e o corpo residual com uma estrela. (C) Diagrama simplificado do processo de divisão do *Toxoplasma gondii* por endodiogenia. No início da divisão, dois complexos apicais começam a se desenvolver no meio da célula lembrando um conóide rudimentar e um centro organizador de microtúbulos. O núcleo assume formato de ferradura. À medida em que o complexo interno se estende a partir destas estruturas, o núcleo, apicoplasto e a mitocôndria dividem-se entre as duas células filhas em formação. Ao término, as células filhas brotam e são envoltas pela membrana plasmática da célula mãe até a cisão completa. As células podem permanecer unidas por um corpo residual. Barras: 1µm.

PERSPECTIVAS

A evolução e o surgimento de novas técnicas têm contribuído para o melhor conhecimento da ultraestrutura de *T. gondii*, permitindo a correlação entre forma e função. Da descrição inicial de Nicolle e Manceaux na Tunísia e de Alfonso Splendore no Brasil,

cem anos atrás, até nossos dias, várias descobertas importantes sobre a estrutura e biologia foram sendo elucidadas graças a técnicas de microscopia eletrônica e óptica. Mesmo assim, muitos aspectos ainda permanecem obscuros, tais como: localização precisa da rede subpelicular no sistema película-microtúbulos; dinâmica de secreção dos micronemas; possível existência de uma associação entre envoltório nuclear/retículo endoplasmático/apicoplasto; forma como os grânulos densos dão origem à rede intravacuolar, dentre outros aspectos do ciclo intracelular de *T. gondii*. A partir destas informações e de sua associação a dados moleculares e bioquímicos, será possível entender melhor a organização morfo-funcional de *T. gondii* e desenvolver novas terapias de combate a esse intrigante parasito e à doença causada por ele, a toxoplasmose.

AGRADECIMENTOS

O trabalho realizado pelo grupo vem sendo apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

REFERÊNCIAS

- Luder CG, Bohne W, Soldati D. Toxoplasmosis: a persisting challenge. *Trends Parasitol.* 2001;17:460-3.
- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004;363:1965-76.
- Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du *gondi*. *C R. Seances Acad Sci.* 1908;147:763-6.
- Splendore A. Um nuovo protozoa parassita de' conigli, incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. *Rev Soc Scien São Paulo.* 1908;3:109-12.
- De Souza W. The fine structure of the conoid of *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop. Sao Paulo.* 1974;16:32-8.
- Morrisette N, Sibley LD. Cytoskeleton of Apicomplexa Parasites. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66:21-38.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000;30:1217-58.
- Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:569-88.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:267-99.
- Dubey JP, Frenkel JK. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and development of toxoplasmosis cysts. *J Protozool.* 1976;23:537-46.
- Boyer K, Mcleod R. Toxoplasmosis. In: Long S, Prober S, Pickering L, editors. Principles and practice of pediatric infectious diseases. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 2007. p.1303-22.
- Cintra WM, De Souza W. Distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes in the cell membranes of *Toxoplasma gondii*. *Eur J Cell Biol.* 1985;37:63-9.
- Nichols BA, Chiappino ML, Pavesio CE. Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* 1994;80:91-8.
- De Souza W. Demonstration and structure of the microtubular system of *Toxoplasma gondii*. *C R Acad Sci D.* 1972;275:2899-901.
- Morrisette NS, Murray JM, Roos DS. Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 1997;110:35-42.
- Hu K, Roos D, Murray JM. A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *J Cell Biol.* 2002;156:1039-50.
- Mondragon R, Frixione E. Ca²⁺-dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J Eukaryot Microbiol.* 1996;43:120-7.
- Mann T, Beckers C. Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;115:257-68.
- Lemgruber L, Kloetzel JA, De Souza W, et al. *Toxoplasma gondii*: further studies on the subpellicular network. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:706-9.
- Hu K. Organizational changes of the daughter basal complex during the parasite replication of *Toxoplasma gondii*. *Pathog [Internet].* 2008;4(1):e10. DOI:10.1371/journal.ppat.0040010
- Johnson TM, Rajfur Z, Jacobson K, et al. Immobilization of the type XIV myosin complex in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biol Cell.* 2007;18:3039-46.
- Keeley A, Soldati D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol.* 2004;14:528-32.
- Jewett TJ, Sibley LD. Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol Cell.* 2003;11:885-94.
- Buscaglia CA, Coppens I, Hol WG, et al. Sites of interaction between aldolase and thrombospondin-related anonymous protein in *Plasmodium*. *Mol Biol Cell.* 2003;14:4947-57.
- Baum J, Papenfuss AT, Baum B, et al. Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4:621-8.
- Schwartzman JD, Pfefferkorn ER. Immunofluorescent localization of myosin at the anterior pole of the coccidian, *Toxoplasma gondii*. *J Protozool.* 1983;30:657-61.
- Shaw MK, Tilney LG. Induction of an acrosomal process in *Toxoplasma gondii*: visualization of actin filaments in a protozoan parasite. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:9095-9.
- Carruthers VB, Tomley FM. Microneme proteins in apicomplexans. *Subcell Biochem.* 2008;47:33-45.
- Lovett JL, Marchesini N, Moreno SN, et al. *Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca(2+) release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. *J. Biol Chem.* 2002;277:25870-6.

30. Boothroyd JC, Dubremetz JF. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma gondii*. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:79-88.
31. Carruthers VB, Giddings OK, Sibley LD. Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cell Microbiol*. 1999;1:225-35.
32. Mercier C, Adjogble KD, Däubener W, et al. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol*. 2005;35:829-49.
33. Cesbron-Delauw MF, Gendrin C, Travier L, et al. Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic*. 2008;9:657-64.
34. Joiner KA, Roos DS. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J Cell Biol*. 2002;157:557-63.
35. Hager KM, Striepen B, Tilney LG, et al. The nuclear envelope serves as an intermediary between the ER and Golgi complex in the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*. 1999;112:2631-8.
36. Pelletier L, Stern CA, Pypaert M, et al. Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Nature*. 2002;418:548-52.
37. He C. Golgi biogenesis in simple eukaryotes. *Cell Microbiol*. 2007;9:566-72.
38. Shaw MK, Roos DS, Tilney LG. Acidic compartments and rhoptry formation in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol*. 1998;117:435-43.
39. Que X, Ngo H, Lawton J, et al. The cathepsin B of *Toxoplasma gondii*, toxopain-1, is critical for parasite invasion and rhoptry protein processing. *J Biol Chem*. 2002;277:25791-7.
40. Miller SA, Thathy V, Ajioka JW, et al. TgSUB2 is a *Toxoplasma gondii* rhoptry organelle processing proteinase. *Mol Microbiol*. 2003;49:883-94.
41. Ngô HM, Yang M, Joiner KA. Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules? *Mol Microbiol*. 2004;52:1531-41.
42. Ding M, Clayton C, Soldati D. *Toxoplasma gondii* catalase: are there peroxisomes in toxoplasma? *J Cell Sci*. 2000;113:2409-19.
43. Seeber F, Ferguson DJ, Gross U. *Toxoplasma gondii*: a paraformaldehyde-insensitive diaphorase activity acts as a specific histochemical marker for the single mitochondrion. *Exp Parasitol*. 1998;89:137-9.
44. Melo EJ, Attias M, de Souza W. The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J Struct Biol*. 2000;130:27-33.
45. Tanabe K. Visualization of the mitochondria of *Toxoplasma gondii*-infected mouse fibroblasts by the cationic permeant fluorescent dye rhodamine 123. *Experientia*. 1985; 1:101-2.
46. Vercesi AE, Rodrigues CO, Uyemura SA, et al. Respiration and oxidative phosphorylation in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*. 1998;273:31040-7.
47. Denton H, Roberts CW, Alexander J, et al. Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol Lett*. 1996;137:103-8.
48. Dzierszynski F, Popescu O, Toursel C, et al. The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* expresses two functional plant-like glycolytic enzymes. Implications for evolutionary origin of apicomplexans. *J Biol Chem*. 1999; 274:24888-95.
49. Seeber F. Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2003; 3:99-109.
50. Asai T, O'Sullivan WJ, Kobayashi M, et al. Enzymes of the de novo pyrimidine biosynthetic pathway in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. 1983;7:89-100.
51. Köhler S, Delwiche C, Denny D, et al. A plastid of probable green alga origin in Apicomplexa parasites. *Science*. 1997;275:1485-9.
52. Gleeson MT. The plastid in Apicomplexa: what use is it? *Int J Parasitol*. 2000; 30:1053-70.
53. Williamson DH, Wilson RJ, Bates PA, et al. Nuclear and mitochondrial DNA of the primate malarial parasite *Plasmodium knowlesi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1985;14: 199-209.
54. Gardner MJ, Bates PA, Ling IT, et al. Mitochondrial DNA of the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1988;31:11-7.
55. Feagin JE, Parsons M. The apicoplast and Mitochondrion of *Toxoplasma gondii*. In: Weiss LM, Kim K, editors. *Toxoplasma gondii: the model Apicomplexan: perspectives and methods*. London: Academic Press; 2007. p.207-43.
56. McFadden GI, Reith ME, Munholland J, et al. Plastid in human parasites. *Nature*. 1996;381:482.
57. Delwiche CF, Palmer JD. The origin of plastids and their spread via secondary endosymbiosis. In: Bhattachary D, editor. *Origins of algae and their plastids*. Wien: Springer; 1997. p.53-86.
58. van Dooren GG, Schwartzbach SD, Osafune T, et al. Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1541: 34-53.
59. van Dooren GG, Tomova C, Agrawal S, et al. *Toxoplasma gondii* Tic20 is essential for apicoplast protein import. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:13574-9.
60. Waller RF, Keeling PJ, Donald RG, et al. Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:12352-7.
61. Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, et al. Inhibitors of nonmevalonate pathway of isoprenoids biosynthesis as antimalarial drugs. *Science*. 1999;285:1573-6.
62. Vollmer M, Thomsen N, Wiek S, et al. Apicomplexan parasites possess distinct nuclear-encoded, but apicoplast-localized, plant-type ferredoxin-NADP⁺ reductase and ferredoxin. *J Biol Chem*. 2001;276:5483-90.
63. Thomsen-Zieger N, Schachter J, Seeber J. Apicomplexan parasites contain a single lipoic acid synthase located in the plastid. *FEBS Lett*. 2003;547:80-6.
64. Gardner MJ, Hall N, Fung E, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2002;419:498-511.
65. Luo S, Ruiz FA, Moreno SN. The acidocalcisome Ca²⁺-ATPase (TgA1) of *Toxoplasma gondii* is required for polyphosphate storage, intracellular calcium homeostasis and virulence. *Mol Microbiol*. 2005;55:1034-45.
66. Charron AJ, Sibley LD. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*. 2002;115:3049-59.
67. Quittnat F, Nishikawa Y, Stedman TT, et al. Host cell lipids control cholesterol ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. *Mol Biochem Parasitol*. 2004;138:107-22.
68. Nishikawa Y, Quittnat F, Stedman TT, et al. On the biogenesis of lipid bodies in ancient eukaryotes: synthesis of triacylglycerols by a *Toxoplasma* DGAT1-related enzyme. *Cell Microbiol*. 2005;7:849-67.

69. Dubremetz JF, Garcia-Réguet N, Conseil V, et al. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol.* 1998;28:1007-13.
70. Charron AJ, Sibley LD. Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic.* 2004;5:855-67.
71. Mordue DG, Desai N, Dustin M, et al. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med.* 1999;190:1783-92.
72. Alexander DL, Mital J, Ward GE, et al. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *PLoS Pathog* [Internet]. 2005;1:e17. DOI:10.1371/journal.ppat.0010017.
73. Mordue DG, Håkansson S, Niesman I, et al. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic and exocytic vesicular trafficking pathways. *Exp Parasitol.* 1999;92:87-99.
74. Håkansson S, Charron AJ, Sibley LD. *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *EMBO J.* 2001; 20:3132-44.
75. Coppens I, Joiner KA. Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* cell entry by modulating organelle discharge. *Mol Biol Cell.* 2003;14:3804-20.
76. Suss-Toby E, Zimmerberg J, Ward GE. *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proc Natl. Acad Sci USA.* 1996;93:8413-8.
77. Beckers CJ, Dubremetz JF, Mercereau-Puijalon O, et al. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP 2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J Cell Biol.* 1994; 127:947-61.
78. Sinai AP, Joiner KA. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol.* 2001;9:95-108.
79. Martin AM, Liu T, Lynn BC, et al. The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. *J Eukaryot Microbiol.* 2007;54:25-8.
80. Halonen SK, Weidner E. Overcoating of *Toxoplasma* parasitophorous vacuoles with host cell vimentin type intermediate filaments. *J Eukaryot Microbiol.* 1994;41:65-71.
81. Lemgruber L, De Souza W, Vommaro RC. Freeze-fracture study of the dynamics of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole development. *Micron.* 2008;39:177-83.
82. Schwab JC, Beckers CJM, Joiner KA. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91:509-13.
83. Sibley LD, Niesman IR, Parmley SF, et al. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 1995;108:1669-77.
84. Magno R, Lemgruber L, Vommaro RC, et al. Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc Res Tech.* 2005;67:45-52.
85. Sheffield HG, Melton ML. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.* 1968;54:209-26.
86. Nishi M, Hu K, Murray JM, et al. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 2008;121:1559-68.
87. Breinich MS, Ferguson DJ, Foth BJ, et al. A dynamin is required for the biogenesis of secretory organelles in *Toxoplasma gondii*. *Curr Biol.* 2009;19:277-86.
88. van Dooren GG, Reiff SB, Tomova C, et al. A novel dynamin-related protein has been recruited for apicoplast fission in *Toxoplasma gondii*. *Curr Biol.* 2009;19:267-76.
89. Agop-Nersesian C, Naissant B, Ben Rached F, et al. Rab11A-controlled assembly of the inner membrane complex is required for completion of Apicomplexan cytokinesis. *PLoS Pathog* [Internet]. 2009;5(1):e1000270. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000270