



ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE
DE LISBOA



POLITÉCNICO
DE LISBOA

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

**Estabelecer culturas de organóides de intestino como modelo para
estudar a expressão de genes da fase sexuada de *Toxoplasma gondii***

Madalena Fernandes Esteves

Orientadora: Doutora Dulce Maria Metelo Fernandes dos Santos

Orientadora: Professora Doutora Sofia Bizarro Nolasco da Silva Narciso

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa, 2022

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

Estabelecer culturas de organóides de intestino como modelo para estudar a expressão de genes da fase sexuada de *Toxoplasma gondii*

Madalena Fernandes Esteves

Orientadora: Doutora Dulce Maria Metelo Fernandes dos Santos

Orientadora: Professora Doutora Sofia Bizarro Nolasco da Silva Narciso

Júri:



Presidente: Professora Doutora Maria Helena Antunes Soares

Arguente: Professora Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

(esta versão incluiu as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, 2022

 <p>ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA <small>INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA</small></p>  <p>IPL INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA</p>
Mestrado em Tecnologias Moleculares
Estabelecer culturas de organóides de intestino como modelo para estudar a expressão de genes da fase sexuada de <i>Toxoplasma gondii</i>
Madalena Fernandes Esteves
2022

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer às minhas orientadoras Doutora Dulce Santos e Professora Doutora Sofia Nolasco, por me terem guiado durante todo este projeto, agradeço os ensinamentos, a paciência e toda a dedicação demonstradas.

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) e ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) pela oportunidade de realizar este projeto. Agradeço a todos os membros do laboratório, em especial ao Doutor Alexandre Leitão e à Professora Inês Delgado por todo o apoio prestado.

Agradeço ao Hospital Escolar Veterinário, da Faculdade de Medicina Veterinária, em especial ao Doutor Rodolfo Oliveira Leal pelo fornecimento das amostras utilizadas.

Faço um especial agradecimento à Doutora Noélia Custódio do Laboratório Maria Carmo-Fonseca, Instituto de Medicina Molecular (IMM) sem a qual este projeto não teria sido realizado.

Finalmente, agradeço à minha família e amigos, em especial aos meus pais que sempre me guiaram e apoiaram em todos os momentos da minha vida.

FINANCIAMENTO

Este projeto foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), com a referência FCT #UIDB/00276/2020.

RESUMO

Os organóides de intestino são estruturas celulares semelhantes ao epitélio intestinal *in vivo*, podendo ser utilizados para estudar protozoários como o *Toxoplasma gondii*. O *T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório capaz de infectar várias espécies, incluindo humanos. O ciclo de vida do parasita apresenta duas fases – assexuada e sexuada. Esta última só ocorre no intestino dos felinos (hospedeiro definitivo). Recentemente um estudo utilizando organóides de intestino provou que são as altas concentrações de ácido linoleico no intestino dos felinos que despoletam o desenvolvimento sexuado deste parasita e que inibindo a enzima que o degrada é possível despoletar este desenvolvimento em células intestino de ratinho (*Mus musculus*). O nosso trabalho teve como principal objetivo estabelecer culturas de organóides de intestino de gato (*Felis silvestres catus*) e de ratinho para estudar a expressão de genes específicos da fase sexuada. Estabelecemos organóides de intestino de ratinho e monocamadas derivadas destes, confirmando a existência de enterócitos nestas estruturas. Inoculámos taquizoítos de *T. gondii* em monocamadas derivadas de organóides e em células HFF suplementadas com ácido linoleico e inibidor SC-26196, para testar a existência de desenvolvimento sexuado nas células de organóides de intestino de ratinho e em células distintas destas, na presença de elevadas concentrações de ácido linoleico e do inibidor da enzima que o degrada. Analisámos a existência de toxicidade causada nas células de organóides de intestino e em células HFF e nos taquizoítos por microscopia ótica de campo claro e por imunofluorescência indireta. Não observámos indícios de toxicidade. Analisámos a existência de desenvolvimento sexuado dos taquizoítos usando como marcadores deste desenvolvimento o aumento da expressão dos genes *TgMob1* e *TgLats*. Não observámos aumento da expressão destes genes indicando que não houve desenvolvimento sexuado dos taquizoítos.

Palavra chave: *Toxoplasma gondii*; Organóides de intestino; Desenvolvimento sexuado; Taquizoítos.

ABSTRACT

Intestinal organoids are cellular structures similar to the intestinal epithelium *in vivo* and can be used to study protozoa such as *Toxoplasma gondii*. *T. gondii* is an obligate intracellular parasite capable of infecting several species, including humans. The life cycle of the parasite has two phases – asexual and sexual. The latter only occurs in the

intestine of felines (definitive host). Recently, a study using intestinal organoids proved that it is the high concentrations of linoleic acid in the intestine of felines that trigger the sexual development of this parasite and that by inhibiting the enzyme that degrades it, it is possible to trigger this development in mouse intestine cells (*Mus musculus*). The main objective of our work was to establish cultures of cat (*Felis silvestres catus*) and mouse intestinal organoids to study the expression of specific genes of the sexual phase. We established mouse intestinal organoids and monolayers derived therefrom, confirming the existence of enterocytes in these cell structures. We inoculated *T. gondii* tachyzoites into organoid-derived monolayers and into HFF cells supplemented with linoleic acid and SC-26196 inhibitor, to test for sexual development in mouse intestinal organoid cells and cells other than these, in the presence of high concentrations of linoleic acid and the inhibitor of the enzyme that degrades it. We analyzed the existence of toxicity caused in these intestinal organoid cells and HFF cells and in tachyzoites by bright field optical microscopy and by indirect immunofluorescence. We observed no signs of toxicity. We analyzed the existence of sexual development of tachyzoites using the increase in the expression of *TgMob1* and *TgLats* genes as markers of this development. We did not observe an increase in these genes' expression, indicating no sexual development of the tachyzoites.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Intestinal Organoids, Sexual development, Tachyzoites.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	pág.i
Financiamento.....	pág.iii
Resumo.....	pág.v
Abstract.....	pág.v
Índice de tabelas.....	pág.ix
Índice de figuras.....	pág.ix
Lista de Abreviaturas.....	pág.xv
I. Introdução Teórica.....	pág.1
1. <i>Toxoplasma gondii</i>	pág.1
1.1. História do <i>Toxoplasma gondii</i>	pág. 1
1.2. Biologia e Morfologia das Formas Infecciosas.....	pág. 1
1.3. <i>Toxoplasma gondii</i> e Toxoplasmose.....	pág.4
1.4. Ciclo de vida.....	pág. 5
1.4.1. Desenvolvimento no Hospedeiro Intermediário.....	pág.5
1.4.2. Desenvolvimento no Hospedeiro Definitivo.....	pág.7
2. Organóides.....	pág.8
2.1. História dos Organóides.....	pág.8
2.2. Organóides Intestinais.....	pág. 9
2.2.1. Estrutura e Funcionamento do Intestino Delgado.....	pág.9
2.2.2. Organóides 3D e Respetivas Monocamadas.....	pág.11
2.2.3. Organóides e Monocamadas de Intestino para Estudar Protozoários e as suas Infeções.....	pág.13
2.2.4. Organóides e Monocamadas de Intestino para Estudar o <i>Toxoplasma gondii</i>	pág.14
II. Objetivos.....	pág.17

III. Materiais e Métodos.....	pág.19
1. Material Biológico e Taquizoítos.....	pág. 19
2. Estabelecimento da Linha de Organóides.....	pág.19
3. Passagem de Organóides.....	pág.21
4. Estabelecimento das Monocamadas.....	pág.22
5. Cultura e Passagem de Células HFF e de Taquizoítos.....	pág.22
6. Experiências com Ácido Linoleico e o Inibidor da Enzima que o Degrada.....	pág.23
6.1. Testes das Concentrações de Ácido Linoleico e do Inibidor da Enzima que o Degrada.....	pág.23
6.2. Experiência para Analisar a Expressão de Genes Relacionados com a Fase Sexuada.....	pág.23
7. Extração e Quantificação de RNA.....	pág.23
8. Síntese de cDNA e PCR em Tempo Real.....	pág.25
9. Imunofluorescência Indireta.....	pág.26
10. Testes Estatísticos.....	pág.27
11. Considerações Ético-Legais.....	pág.28
IV. Resultados.....	pág.29
1. Estabelecimento da Linha de Organóides e Monocamadas.....	pág.29
1.1. Análise da Presença de Junções Apertadas nas Monocamadas Provenientes dos Organóides.....	pág.32
2. Análise do Efeito do Ácido Linoleico e do Inibidor nas Células HFF e nos Taquizoítos.....	pág.33
2.1. Análise do Efeito do Ácido Linoleico e do Inibidor nas Células HFF e nos Taquizoítos por Microscopia Ótica de Campo Claro.....	pág. 33
2.2. Análise do Efeito do Ácido Linoleico e do Inibidor nas Células HFF e nos Taquizoítos por Microscopia de Fluorescência – Imunofluorescência Indireta.....	pág.34

3. Análise do Efeito do Ácido Linoleico e Inibidor na Expressão de Genes da Fase Sexuada do Parasita.....	pág.36
3.1. Análise do Efeito do Ácido Linoleico e Inibidor na Expressão de Genes da Fase Sexuada do Parasita quando Inoculados em Células HFF.....	pág.36
3.2. Análise do Efeito do Ácido Linoleico e Inibidor na Expressão de Genes da Fase Sexuada do Parasita quando Inoculados em Monocamadas Provenientes de Organóides Intestinais.....	pág.38
V. Discussão.....	pág.39
VI. Conclusão.....	pág.45
VII. Bibliografia.....	pág.47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1. Concentrações/proporções finais dos compostos utilizados no meio de organóide.....	pág.21
Tabela 3.2. Primers utilizados no PCR em tempo real	pág.26
Tabela 3.3. Anticorpos utilizados na imunofluorescência	pág.27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da organização estrutural das fases de desenvolvimento do <i>Toxoplasma gondii</i> . (A) Taquizoíta; (B) Bradizoíta; (C) Esporozoíta. Adaptado de (J. P. Dubey, Lindsay, & Speer, 1998). Permissão de utilização de imagem obtida de Copyright Clearance Center (CCC)	pág.2
Figura 2. Organelos secretores do <i>T. gondii</i> . a) secreção de proteínas por parte das micronemas durante infecção das células hospedeiras; b) secreção de proteínas por parte das róptrias durante infecção das células hospedeiras. Adaptado de (Attias et al., 2020). Permissão de utilização de imagem obtida de: https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/deed.pt	pág.3

Figura 3. Vias de transmissão do *T. gondii*. a) hospedeiro definitivo – felino; b) oocistos não esporulados nas fezes do gato; c) alimentos e água contaminada com oocistos esporulados; d/e) oocistos ingeridos por hospedeiros intermediários (humanos; vacas; cabras; galinhas; etc) através dos vegetais e frutas ou água; f) ingestão de quistos teciduais existentes na carne pelo hospedeiro definitivo ou por parte dos humanos (g); h) transmissão congénita de taquizoítos através da placenta; i) transmissão através de transfusões sanguíneas; j) transmissão através do transplante de órgãos. Adaptado de (Attias et al., 2020). Permissão de utilização de imagem obtida de: <https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/deed.pt>.....pág.4

Figura 4. Fase sexuada do *T. gondii*. Após ingestão dos quistos teciduais ou oocistos esporulados, os bradizoítos ou esporozoítos vão invadir os enterócitos e vão entrar no ciclo entérico que dá origem aos esquizontes que podem apresentar vários tipos morfológicos (A-E). Estes vão dividir-se por esquizogonia dando origem aos merozoítos que maturam e dão origem aos macro e microgâmetas que irão fundir e dar origem a um oocisto imaturo contendo um esporoblasto. Uma vez libertado nas fezes este oocisto vai maturar e dar origem a um oocisto esporulado. Retirado de (Moura et al., 2009). Permissão de utilização de imagem: <https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/deed.pt>.....pág.8

Figura 5. Representação esquemática do epitélio intestinal, incluindo os vários tipos de células que o constituem. Adaptado de (Meneses et al., 2016). Permissão de utilização de imagem: <https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/deed.pt>.....pág.10

Figura 6. Vias de sinalização envolvidas na proliferação e manutenção das CBC. As vias de sinalização Wnt e Notch estão envolvidas na proliferação e manutenção das CBC. A via de sinalização BMP potencia a diferenciação das CBC nos diferentes tipos celulares encontrados no epitélio intestinal. A via de sinalização EGF potencia a proliferação das CBC. Adaptado de (Date & Sato, 2015). Permissão de utilização de imagem obtida de Copyright Clearance Center (CCC).pág.11

Figura 7. Desenvolvimento das ISC em organóides. Quando postas em cultura em Matrigel™ com os suplementos necessários para o desenvolvimento das células do epitélio intestinal as ISC proliferam e diferenciam-se, formando estruturas com os vários tipos de células encontradas no intestino delgado. As vilosidades apresentam as células das criptas (ISC e células de Paneth). Os enterócitos, células enteroendócrinas e células caliciformes, encontram-se na base das vilosidades dos organóides. Adaptado de (Date

& Sato, 2015). Permissão de utilização de imagem obtida de Copyright Clearance Center (CCC).pág.11

Figura 8. Células obtidas do gato B, 0 e 4 dias em cultura. A observação das células foi feita por microscopia ótica de campo claro. (A) Células imediatamente após inoculação, dia 0; (B) Crescimento das células ao fim de 4 dias. Apesar de ser possível observar agregados celulares em ambos os tempos de cultura, não houve proliferação celular, nem a conseqüente formação de organóides. A imagem não apresenta barra de escala pois as fotografias foram obtidas por microscopia ótica de campo claro, usando a objetiva de 60X e câmara do telemóvel.....pág.29

Figura 9. Desenvolvimento das criptas obtidas da amostra de ratinho em organóides. A observação das células foi feita por microscopia ótica de campo claro. (A) Após inoculação, dia 0; (B) Após 2 dias em cultura; (C) Após 4 dias em cultura; (D) Após 6 dias em cultura. Ocorreu proliferação celular por parte das criptas e formação de estruturas esféricas com vilosidades (organóides). A imagem não apresenta barra de escala pois as fotografias foram obtidas por microscopia ótica de campo claro, usando a objetiva de 20X e câmara do telemóvel.....pág.30

Figura 10. Monocamadas estabelecidas a partir dos organóides de intestino de ratinho. A observação das células foi feita por microscopia ótica de campo claro. (A) Imediatamente após inoculação; (B) 24 horas após inoculação. Observou-se aderência ao colagénio por parte das células ao fim de 24 horas de inoculação, no entanto, não se observou proliferação por parte das mesmas, nos dias seguintes. A imagem não apresenta barra de escala pois as fotografias foram obtidas por microscopia ótica de campo claro, usando a objetiva de 20X e câmara do telemóvel.....pág.31

Figura 11. Expressão relativa de *Vil1* nas amostras de organóides, monocamadas e intestino de ratinho. Observou-se expressão do gene *Vil1* por parte de todas as amostras. Está representada a expressão relativa \pm S.D (barras de erro) do gene *Vil1*. Os valores da expressão de *Vil1* foram normalizados utilizando a expressão do gene *Hprt1*.....pág.32

Figura 12. Efeito do ácido linoleico e inibidor (SC-26196) em células HFF ao fim de 24 horas de invasão por *T. gondii*. A observação das células foi feita por microscopia ótica de campo claro. (A) Células HFF suplementadas com 20mM de DMSO e inoculadas com *T. gondii* – controlo; (B) Células HFF suplementadas com 20mM de Ácido Linoleico, 20 μ M de Inibidor (SC-26196) e inoculadas com *T. gondii* – teste. Não são observáveis

diferenças na densidade celular, indícios de morte celular (células redondas e células não aderidas), ou aparentes diferenças na invasão dos taquizoítos, entre as amostras controlo e teste. A imagem não apresenta barra de escala pois as fotografias foram obtidas por microscopia ótica de campo claro, usando a objetiva de 60X e câmara do telemóvel.....pág.33

Figura 13. Efeito do ácido linoleico e inibidor (SC-26196) em células HFF ao fim de 48 horas de invasão por *T. gondii*. A observação das células foi feita por microscopia ótica de campo claro. (A) Células HFF suplementadas com 20mM de DMSO e inoculadas com *T. gondii* – controlo; (B) Células HFF suplementadas com 20mM de Ácido Linoleico, 20µM de Inibidor (SC-26196) e inoculadas com *T. gondii* – teste. Não são observáveis diferenças na densidade celular, indícios de morte celular (células redondas e células não aderidas), ou aparentes diferenças na invasão dos taquizoítos, entre as amostras controlo e teste. A imagem não apresenta barra de escala pois as fotografias foram obtidas por microscopia ótica de campo claro, usando a objetiva de 60X e câmara do telemóvel.....pág.34

Figura 14. Efeito do ácido linoleico e inibidor (SC-26196) nos taquizoítos. Célula HFF suplementada com ácido linoleico e inibidor (SC-26196) (+) ou suplementadas com DMSO (-) durante 24 horas e inoculadas com taquizoítos após este período. Ao fim de 24 horas de invasão dos taquizoítos processou-se a imunofluorescência. Utilizou-se o meio de montagem Fluoromount-G com DAPI para visualizar o núcleo dos taquizoítos, o anticorpo monoclonal anti-tubulina glutaminada (GLU) para visualizar o citoesqueleto de tubulina, o complexo apical e as células filhas e o anticorpo policlonal anti-cofator B da tubulina (TBCB) para visualizar o polo anterior. Não se observou diferenças estruturais significativas, nem alterações na replicação ativa dos taquizoítos entre as amostras (+) e (-). Estes resultados são equivalentes entre as duas amostras, indicando que a presença de ácido linoleico e inibidor (SC-26196) não causaram alterações significativas no ciclo lítico do parasita.....pág.35

Figura 15. Análise da expressão relativa de *TgMob1*, *TgLats* e *TgTbcb* em taquizoítos após 24h de invasão. As células HFF foram suplementadas com ácido linoleico e Inibidor (SC-26196) (teste) ou com DMSO (controlo). Os *T. gondii* foram recolhidos após 24 horas de invasão. Não existiram diferenças significativas entre as amostras controlo e teste para nenhum dos genes estudados, indicando que não houve desenvolvimento da fase sexuada do ciclo de vida. Está representada a expressão relativa ± S.D (barras de erro) dos genes de 3 experiências independentes. Os valores da expressão dos

genes analisados foram normalizados utilizando a expressão do gene *Gapdh*. ns – valores de p não significativos.....pág.37

Figura 16. Análise da expressão relativa de *TgMob1*, *TgLats* e *TgTbcb* em taquizoítos após 48h de invasão. As células HFF foram suplementadas com ácido linoleico e Inibidor (SC-26196) (teste) ou com DMSO (controle). Os *T. gondii* foram recolhidos após 48 horas de invasão. Verificou-se uma diminuição significativa ($p < 0.05$) na expressão dos genes *TgLats* e *TgMob1* nas amostras teste comparativamente às amostras controle, por outro lado, não se observou diferenças significativas na expressão do gene *TgTbcb*. Estes resultados indicam que não existiu desenvolvimento da fase sexuada do ciclo de vida em nenhuma das amostras. Está representada a expressão relativa \pm S.D (barras de erro) dos genes de 3 experiências independentes. Os valores da expressão dos genes analisados foram normalizados utilizando a expressão do gene *Gapdh*. ns – valores de p não significativos, * $p < 0,05$pág.37

Figura 17. Efeito do ácido linoleico e inibidor (SC-26196) em monocamadas provenientes de organóides de intestino ao fim de 24 horas pós invasão com *T. gondii*. A observação das células foi feita por microscopia ótica de campo claro. (A) Monocamadas provenientes de organóides intestinais suplementadas com 20 mM de DMSO e inoculadas com *T. gondii* – controle; (B) Monocamadas provenientes de organóides intestinais suplementadas com 20 mM de Ácido Linoleico, 20 μ M de Inibidor (SC-26196) dissolvido em DMSO e inoculadas com *T. gondii* – teste. Não se verificou diferenças na morte células ou na capacidade de invasão dos taquizoítos, entre as amostras controle e teste. A imagem não apresenta barra de escala pois as fotografias foram obtidas por microscopia ótica de campo claro, usando a objetiva de 60X e câmara do telemóvel.....pág. 38

Figura 18. Análise da expressão relativa de *TgMob1*, *TgLats* e *TgTbcb* em taquizoítos. As monocamadas de intestino de ratinho foram suplementadas com ácido linoleico e Inibidor (SC-26196) (teste) ou com DMSO (controle). Os *T. gondii* foram recolhidos após 24 horas de invasão. Verificou-se uma diminuição significativa ($p < 0.05$) na expressão do gene *TgMob1* nas amostras teste comparativamente às amostras controle, por outro lado, não se observou diferenças significativas nas expressões dos genes *TgLats* e *TgTbcb*. Estes resultados indicam que não existiu desenvolvimento da fase sexuada do ciclo de vida em nenhuma das amostras. Está representada a expressão relativa \pm S.D dos genes de 3 experiências independentes. Os valores da expressão dos genes analisados foram normalizados utilizando a expressão do gene *Gapdh*. ns – valores de

p não significativos, * $p < 0,05$pág.39

LISTA DE ABREVIATURAS

AMA1 – de “apical membrane antigen 1”, antígeno 1 da membrana apical

CBC – de “crypt base columnar”, colunares basais das criptas

ECM – de “extracellular matrix”, matriz extracelular

EHS – Engelbreth-Holm-Swarm

GRA – de “dense granule proteins”, proteínas dos grânulos densos

HFF – de “human foreskin fibroblasts”, fibroblastos do prepúcio humano

IMC – de “inner membrane complex”, complexo membranar interno

ISC – de “intestinal stem cell”, células estaminais intestinais

LGR5+ – de “leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5”, repetição rica em leucina contendo o receptor acoplado à proteína G

MIC – de “microneme proteins”, proteínas das micronemas

MJ – de “moving junction”, junção de movimento

PV – de “parasitophorous vacuole”, vacúolo parasitóforo

PVM – de “parasitophorous vacuole membrane” membrana do vacúolo parasitóforo

ZO-1 – zonula occludens 1

I. INTRODUÇÃO TEÓRICA

1. *Toxoplasma gondii*

1.1. História do *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* foi observado pela primeira vez em 1908, no Instituto Pasteur em Tunis, por Charles Nicolle e Louis Manceaux quando estes realizavam investigações sobre a leishmaniose. Devido ao desconhecimento sobre este parasita e ao tema da sua investigação Nicolle e Manceaux identificaram erradamente o parasita observado no tecido do *Ctenodactylus gundi*, um roedor, como sendo a Leishmânia. No ano seguinte, através de continuas infeções experimentais e análises microscópicas perceberam tratar-se na verdade de uma espécie até então não identificada, decidindo nomeá-lo de *Toxoplasma gondii* com base na morfologia que observaram (Toxo = arco e plasma = vida) e no hospedeiro (Nicolle & Manceaux, 1908).

Este parasita viria a ser observado em muitas outras espécies de sangue quente incluindo os humanos, demonstrando assim a sua habilidade de parasitar vários mamíferos. Alguns dos casos mais graves de infeção pareciam acontecer em crianças, sendo comuns sintomas de anemia, febre e esplenomegalia (Cheng et al., 2015). Na verdade, a estirpe mais utilizada atualmente em laboratório – RH – foi isolada por Albert Sabin a partir de uma criança de 6 anos cujas iniciais do nome eram R.H. (Sabin, 1941).

Foi em 1970 que os felinos foram identificados como sendo os hospedeiros definitivos do *T. gondii*, pois Frenkel conseguiu observar as fases sexuada e assexuada no intestino de vários gatos. Estas observações confirmaram também a existência de várias fases de desenvolvimento, sendo que duas delas foram nomeadas por Frenkel – taquizoítos, a fase previamente observada por Nicolle e Manceaux, e os bradizoítos (Frenkel, 1973).

1.2. Biologia e Morfologia das Formas Infecciosas

O *T. gondii*, apresenta três fases de desenvolvimento capazes de infetar ou manter a infeção nas células dos hospedeiros (Attias et al., 2020):

- Taquizoítos, fase de multiplicação rápida normalmente encontrada nas infeções agudas. Possui um formato elíptico, com cerca 6µm de comprimento e 2µm de largura;

- Bradizoítos, fase de multiplicação lenta (bradi=lento) normalmente encontrada nas infecções crônicas e que dá origem aos quistos teciduais (aglomeração de bradizoítos dentro das células). Os bradizoítos apresentam perto de 7µm de comprimento e 1,5µm de largura.
- Esporozoíto, formados dentro dos oocistos esporulados. Os oocistos não esporulados apresentam um formato oval com uma membrana dupla, por outro lado, os oocistos esporulados têm um formato elíptico e contêm no seu interior dois esporocistos, cada um destes contendo quatro esporozoítos. Os esporozoítos têm cerca de 6 a 8µm de comprimento e 2µm de largura (Barbosa, Munoz, & Moura, 2014).

Em geral, todas as fases apresentam uma organização primária semelhante (Figura 1) – forma alongada e um complexo apical onde se encontram os organelos secretores (Attias et al., 2020) – mudando no entanto, entre os taquizoítos e as duas outras fases, a posição do núcleo, o número de micronemas e de grânulos densos (Graindorge et al., 2016) . O corpo do parasita é delimitado por uma membrana plasmática. Esta membrana em conjunto com o Complexo Membranar Interno (IMC, de “inner membrane complex”) formam o complexo membranar conhecido como películas. O IMC é formado por duas camadas internas de alvéolos sustentados pela rede subpelicular que se estende desde o anel polar até ao poro posterior, formando aberturas em cada extremidade do parasita.

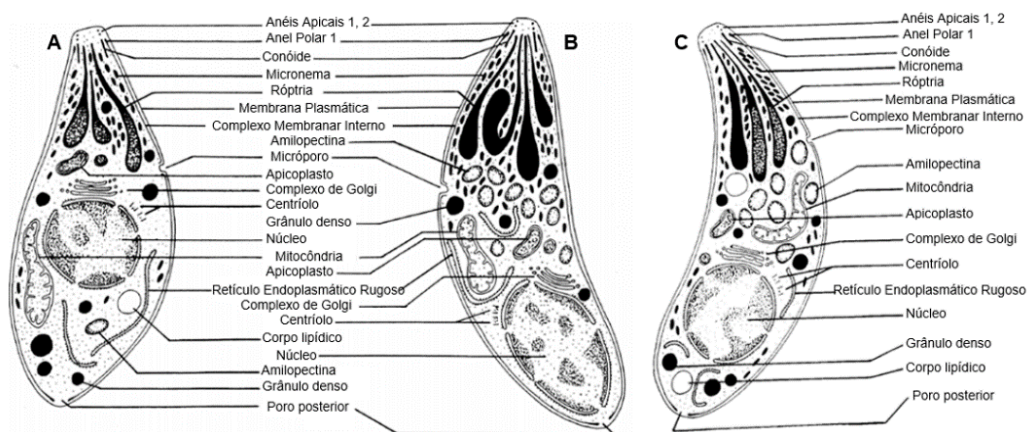


Figura 1. Representação esquemática da organização estrutural das fases de desenvolvimento do *Toxoplasma gondii*. (A) Taquizoíto; (B) Bradizoíto; (C) Esporozoíto. Adaptado de (J. P. Dubey et al., 1998). Permissão de utilização de imagem obtida de Copyright Clearance Center (CCC)

O complexo apical encontra-se na região anterior e é formado pelo conóide, os anéis polares onde estão ancorados os microtúbulos subpeliculares e dois grupos de organelos secretórios – as micronemas e as róptrias (Figura 2) – sendo desta forma

importante no início do processo de infecção (Dubremetz, 1998; Magno, Lemgruber, Vommaro, De Souza, & Attias, 2005).

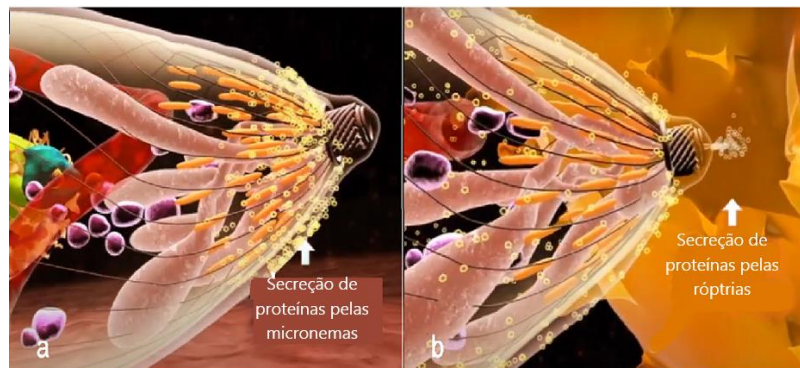


Figura 2. Organelos secretores do *T. gondii*. a) secreção de proteínas por parte das micronemas durante infecção das células hospedeiras; b) secreção de proteínas por parte das róptrias durante infecção das células hospedeiras. Adaptado de (Attias et al., 2020). Permissão de utilização de imagem obtida de: <https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/deed.pt>

As micronemas concentram-se à volta do anel polar, por baixo do sistema membranar e fundem-se com as regiões da zona apical onde existe apenas membrana plasmática (Dubois & Soldati-Favre, 2019). São as primeiras a secretar o seu conteúdo proteico, como as proteínas das micronemas (MIC, de “microneme proteins”) e antigénio 1 da membrana apical (AMA1, de “apical membrane antigen 1”), bastante importantes na invasão da célula hospedeira. Estas proteínas interagem com as proteínas secretadas pelas róptrias. As róptrias são outro grupo de organelos secretórios constituintes do complexo apical e secretam da sua porção basal proteínas ROP e da sua porção anterior proteínas RON. Estas proteínas estão envolvidas na invasão da célula hospedeira e na formação da membrana do vacúolo parasitóforo (PVM, de “parasitophorous vacuole membrane”), local onde os taquizoítos se diferenciam e multiplicam (Kato, 2018).

O conóide é uma das várias estruturas do citoesqueleto de microtúbulos, é constituído por microtúbulos com uma estrutura diferente dos clássicos 13 protofilamentos, em formato de um cilindro oco e inserido dentro do anel polar posterior, do qual emergem 22 microtúbulos – os microtúbulos subpeliculares – que existem abaixo do IMC e se estendem até à região posterior da célula (Attias et al., 2020). O influxo de cálcio causa a movimentação do conóide, importante durante o processo de invasão das células hospedeiras. Para além dos 22 microtúbulos subpeliculares, existem outros dois microtúbulos centrais que atravessam o conóide.

Para além das róprias e das micronemas existe um terceiro grupo de organelos secretores – os grânulos densos. Estes não fazem parte do complexo apical, estando distribuídos pelo parasita. Quando localizadas dentro do vacúolo parasitóforo (PV, de “parasitophorous vacuole”) secretam nas porções laterais e posteriores do parasita um grande número de proteínas dos grânulos densos (GRA, de “dense granule proteins”). As GRA estão envolvidas na montagem/construção das redes de túbulos e filamentos do PV e na replicação existindo em maior quantidade nos esporozoítos (Bougdour, Tardieux, & Hakimi, 2014).

O núcleo tem uma forma esférica com uma concavidade do lado apical e está localizado na zona média da célula. Durante a divisão assume o formato de uma ferradura mantendo a integridade da membrana nuclear. Acima do núcleo, encontram-se o complexo de Golgi e o apicoplasto, que é uma estrutura alongada e delimitada por quatro membranas, normalmente é o primeiro organelo a dividir durante o ciclo celular. Este organelo tem origem endossimbiótica tendo um papel importante nos processos bioquímicos envolvidos no processo de invasão celular (Arisue & Hashimoto, 2015) por parte do parasita.

1.3. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose

O *T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório que apresenta várias vias de transmissão (Figura 3), podendo infetar e parasitar virtualmente qualquer espécie de sangue quente, incluindo os humanos (Jitender P. Dubey, 2013).

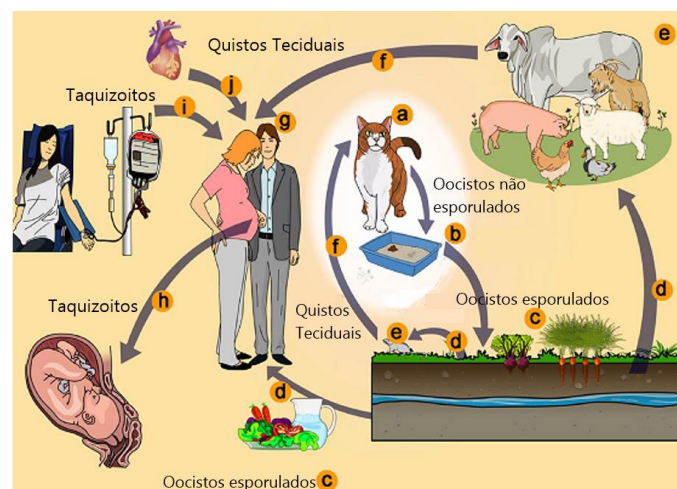


Figura 3. Vias de transmissão do *T. gondii*. a) hospedeiro definitivo – felino; b) oocistos não esporulados nas fezes do gato; c) alimentos e água contaminada com oocistos esporulados; d/e) oocistos ingeridos por hospedeiros intermediários (humanos; vacas; cabras; galinhas; etc) através dos vegetais e frutas ou água; f) ingestão de quistos teciduais existentes na carne pelo hospedeiro definitivo ou por parte dos humanos

(g); h) transmissão congénita de taquizoitos através da placenta; i) transmissão através de transfusões sanguíneas; j) transmissão através do transplante de órgãos. Adaptado de (Attias et al., 2020). Permissão de utilização de imagem obtida de: <https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/deed.pt>

A sua transmissão pode ser horizontal, se a transmissão ocorrer de um hospedeiro para o outro sendo que o *T. gondii* pode circular do hospedeiro definitivo para os hospedeiros intermediários e vice-versa ou vertical/congénita se a transmissão ocorrer da mãe para o feto através da placenta (este tipo de transmissão ocorre com elevada frequência nos hospedeiros intermediários) (Barbosa et al., 2014). No caso da transmissão horizontal, os hospedeiros intermediários são normalmente infetados pela ingestão de carne crua ou malcozinhada que contenham quistos teciduais ou pela ingestão de fruta/vegetais ou água com oocistos esporulados, por outro lado, a maioria dos casos de infeção por parte dos hospedeiros definitivos é devido à ingestão de pressas infetadas com quistos teciduais. No caso de humanos, a ingestão de oocistos esporulados ou quistos teciduais causa uma infeção identificada como toxoplasmose (I. L. S. Delgado et al., 2022).

Uma vez ocorrida a ingestão do parasita este invade e replica-se em vários tipos de tecidos e células, podendo causar infeções agudas ou crónicas graves em indivíduos com um sistema imunitário comprometido. Nestes casos pode existir infeção do musculo, cérebro ou retina, trazendo consequentes alterações neurológicas, musculares e oculares (Hadfield & Guy, 2021).

Devido à sua capacidade de transmissão através da placenta, este parasita consegue também infetar os fetos. Quando esta infeção acontece dá-se o nome de toxoplasmose congénita e nestes casos podem acontecer problemas graves no desenvolvimento do feto, incluindo morte (Weiss & Dubey, 2009).

Desta forma, conhecer o ciclo de vida e os mecanismos de infeção deste parasita é importante para diminuir o seu sucesso de infeção.

1.4. Ciclo de vida

1.4.1. Desenvolvimento no Hospedeiro Intermediário

Após ingestão dos quistos e oocistos esporulados, estes vão contactar com as enzimas do estômago, causando a destruição da parede e a consequente libertação de bradizoítos e esporozoítos, respetivamente. Estes irão diferenciar-se em taquizoítos que

invadem a célula hospedeira (Fréna1, Dubremetz, Lebrun, & Soldati-Favre, 2017). Os taquizoítos necessitam que o seu lado apical interaja com a células hospedeira. Este posicionamento exige a movimentação do parasita e envolve a ligação do complexo motor actina-miosina (glideossoma), localizado entre a membrana plasmática e a pelicula interna do parasita, às proteínas MIC ligadas aos recetores da célula hospedeira. Nesta altura o parasita secreta AMA1 e várias proteínas RON, que vão formar uma junção apertada chamada de junção de movimento (MJ, de “moving junction”) (AMA1-RON). Este complexo vai ancorar o parasita à célula hospedeira permitindo a sua entrada por invaginação da membrana. Durante esta invaginação o parasita forma a PVM (Attias et al., 2020; Blader, Coleman, Chen, & Gubbels, 2015).

Após a formação do PV, o parasita inicia a secreção de proteínas ROP e GRA que alteram o comportamento da célula hospedeira de forma a beneficiar o parasita (Romano & Coppens, 2013; Yubao Wang, Weiss, & Orlofsky, 2010) e alteraram o próprio PV. O PV é uma estrutura bastante importante para o parasita pois confere-lhe proteção e permite a importação de nutrientes que em conjunto com as proteínas secretadas pelo parasita criam um ambiente propício para a replicação dos taquizoítos (Blader & Koshy, 2014). É dentro do PV que estes começam a dividir-se por endodiogenia, um processo de divisão celular em que duas células filhas são formadas dentro da célula mãe. Após vários ciclos de divisão os taquizoítos começam a formar o formato de rosetas.

Para continuar a parasitar outras células o parasita necessita de se movimentar até à célula hospedeira, de entrar na mesma e de sair de dentro dela. Quando este processo de movimentação, entrada e saída (ciclo lítico) se repete várias vezes dizemos que existe uma infeção aguda.

Ao fim de vários ciclos o sistema imunitário do hospedeiro reconhece e identifica o *T. gondii*, permitindo o desenvolvimento de respostas imunitárias contra o parasita. Devido à pressão causada pelo sistema imunitário a PVM dos taquizoítos começa a sofrer alterações que causam a formação do quisto e alteração do metabolismo do parasita de forma que este se diferencie em bradizoítos. Os bradizoítos multiplicam-se em células do sistema nervoso e em células do tecido muscular esquelético e evadem com maior facilidade a resposta imunitária do hospedeiro dado apresentarem uma replicação mais lenta, uma menor atividade metabólica e estarem confinados dentro de um quisto que oferece maior proteção (Cerutti, Blanchard, & Besteiro, 2020). Desta

forma, os bradizoítos causam uma infecção crónica que pode persistir até à morte do hospedeiro (Attias et al., 2020; Hill & Dubey, 2018).

1.4.2. Desenvolvimento no Hospedeiro Definitivo

Após a ingestão de quistos ou oocistos esporulados, estes vão contactar com as enzimas do estômago e a sua parede é destruída libertando bradizoítos e esporozoítos, respetivamente. Estes têm a capacidade de invadir os enterócitos onde se diferenciam em taquizoítos, que invadem outros tipos celulares através do ciclo lítico, ou em esquizontes que fazem parte da fase sexuada, existindo 5 tipos morfológicos diferentes (A-E) (Hill & Dubey, 2018). Estas células vão dividir-se por esquizogonia (ou merogonia), ocorrendo várias divisões mitóticas na mesma célula. Após este processo, dá-se a formação do complexo apical e do IMC, que vão organizar-se à volta de cada um dos núcleos, permitindo assim a sua individualização e conseqüente formação das células filhas – merozoítos – dentro dos enterócitos do hospedeiro (Attias et al., 2020). Nesta altura, dá-se a rutura dos enterócitos e a conseqüente libertação dos merozoítos que têm a capacidade de infetar outros enterócitos e de entrarem repetidamente em esquizogonia, aumentando assim o número de parasitas nas células. Por volta de 3 a 15 dias após a infeção primária os merozoítos podem ser encontrados maioritariamente no íleo e muitos começam a diferenciar-se por gametogénese em macrogâmetas (gâmetas femininos) e microgâmetas (gâmetas masculinos) (Figura 4). A fusão dos gâmetas produz um oocisto imaturo, com formato elíptico contendo no seu interior um único esporoblasto, que é libertado no lúmen intestinal. Mais tarde, este oocisto será libertado nas fezes do felino e o ambiente oxigenado vai desencadear a maturação – esporulação – em que o oocisto se divide em dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada, tornando-se assim oocistos esporulados (Figura 4). Estes são bastante resistentes e podem permanecer viáveis durante vários meses (Moura, Amendoeira, & Barbosa, 2009).

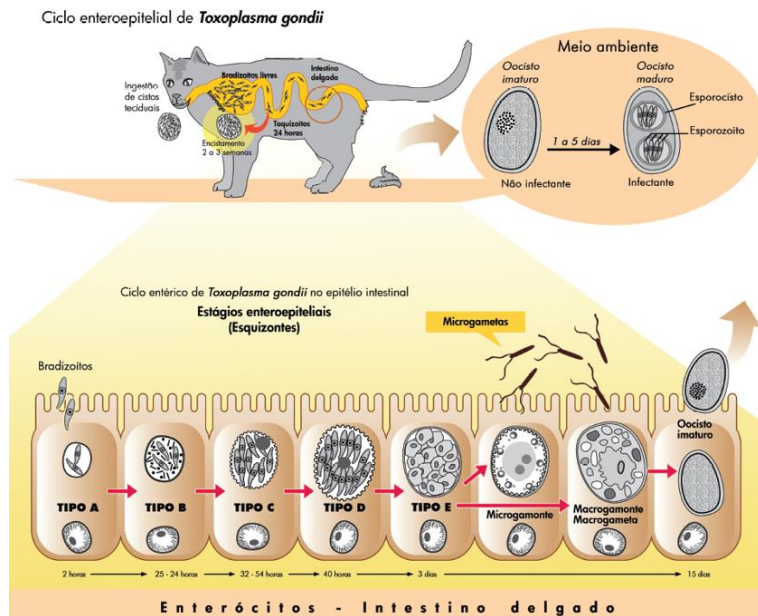


Figura 4. Fase sexuada do *T. gondii*. Após ingestão dos quistos teciduais ou oocistos esporulados, os bradizoítos ou esporozoítos vão invadir os enterócitos e vão entrar no ciclo entérico que dá origem aos esquizontes que podem apresentar vários tipos morfológicos (A-E). Estes vão dividir-se por esquizogonia dando origem aos merozoítos que maturam e dão origem aos macro e microgâmetas que irão fundir e dar origem a um oocisto imaturo contendo um esporoblasto. Uma vez libertado nas fezes este oocisto vai maturar e dar origem a um oocisto esporulado. Retirado de (Moura et al., 2009). Permissão de utilização de imagem: <https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/deed.pt>

2. Organóides

2.1. História dos Organóides

Nos últimos 50 anos tem sido demonstrado que as culturas de células 2D não são representativas da situação *in vivo*, pois em termos estruturais não fornecem as condições necessárias para a organização e relações entre as células observadas em tecidos *in vivo*. Desta forma foi necessário criar uma técnica de cultura representativa destas organizações e relações (Simian & Bissell, 2017).

As culturas 3D são técnicas de cultura que consistem em evitar o contacto direto das células com a superfície da placa de cultura. Atualmente, o termo “organóide” refere-se ao crescimento de células em ambiente 3D que dão origem a aglomerados celulares que se podem organizar e diferenciar em diferentes tipos celulares com funcionalidades semelhantes ao tecido de origem (Simian, Navre, Werb, Lochter, & Bissell, 2001).

Foi por volta do início do século XX que novas técnicas baseadas na ideia de culturas 3D começaram a ser desenvolvidas e utilizadas (Fell & Robison, 1929; Harrison, Greenman, Mall, & Jackson, 1907; Strangeways & Fell, 1926). Neste mesmo século,

foram realizados vários estudos sobre a capacidade regenerativa de células dissociadas, demonstrando que estas células tinham a capacidade de se reagregar e restabelecer a sua estrutura quando postas em culturas 3D (Moscona, 1959; Moscona & Moscona, 1952).

Por volta de 1980, já existiam as ferramentas necessárias para começar a estudar o funcionamento e morfogênese dos tecidos. Estudos mostraram que a matriz extracelular (ECM, de “extracellular matrix”) é bastante importante na regulação génica e na organização estrutural dos tecidos, pois quando as células eram cultivadas em géis ricos em componentes da lâmina basal, entre eles colagénio e laminina (Berry & Friend, 1969; Bissell & Tilles, 1971; Orkin et al., 1977; Swarm, 1963), conseguiam não só sintetizar proteínas específicas do órgão/tecido de origem, mas também formarem uma organização estrutural semelhante à que seria observada *in vivo* (Fong et al., 1991; E. Y. H. P. Lee, Lee, Kaetzel, Parry, & Bissell, 1985).

Na década de 90, outros estudos começaram a testar culturas de organóides 3D de diferentes tecidos, entre eles o intestino. Sato e colegas isolaram células estaminais que expressavam a repetição rica em leucina contendo o recetor acoplado à proteína G (LGR5+, de “leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5”), marcadores das células colunares basais das criptas (CBC, de “crypt base columnar”), e cultivou-as em Matrigel™ – composta por laminina, colagénio e outros compostos semelhantes aos do ECM – suplementada com fatores de crescimento necessários para o crescimento do epitélio intestinal, e viu que estas células geravam a arquitetura do epitélio intestinal em 3D (Sato et al., 2009). Esta metodologia foi depois utilizada em vários outros estudos e permitiu o cultivo de vários outros tecidos de forma bem-sucedida.

2.2. Organóides Intestinais

2.2.1. Estrutura e Funcionamento do Intestino Delgado

O intestino delgado é revestido por protuberâncias chamadas vilosidades compostas por enterócitos (células polarizadas com capacidade de absorção) células enteroendócrinas (produtoras de hormonas) e células caliciformes (produzem e secretam muco) (Derricott et al., 2019). Estas vilosidades são importantes pois aumentam a superfície de absorção do intestino e na sua base apresentam estruturas, chamadas de criptas, que contêm vários tipos de células, entre elas as células estaminais intestinais (ISC, de “intestinal stem cell”) e as células de Paneth. As ISC,

também conhecidas como células colunares basais das criptas (CBC), originam células amplificadoras transitórias que originam os restantes tipos de células do intestino, contribuindo desta forma para a autorrenovação do epitélio intestinal. Por outro lado as células de Paneth têm funções antimicrobianas e de manutenção das células estaminais (Boonekamp, Dayton, & Clevers, 2020; Gassler, 2017; Peterson & Artis, 2014) (Figura 5).

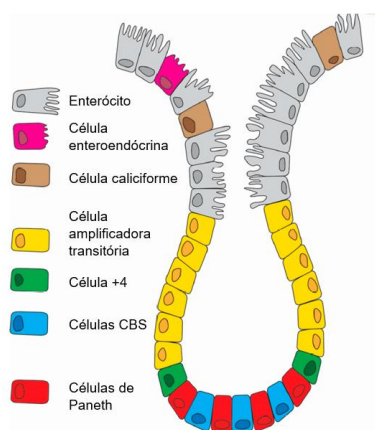


Figura 5. Representação esquemática do epitélio intestinal, incluindo os vários tipos de células que o constituem. Adaptado de (Meneses et al., 2016). Permissão de utilização de imagem: <https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/deed.pt>

Todas estas células podem ser identificadas através da análise da expressão de genes específicos como o *Lgr5* (expresso pelas ISC), *Lys2* (expresso pelas células de Paneth), *Vil1* (expresso pelos enterócitos), *Muc2* (expresso pelas células caliciformes) e *ChgA* (expresso pelas células enteroendócrinas) (Grün et al., 2016; Kramer et al., 2020; Yoshida, Miwa, Kawachi, Kume, & Takahashi, 2020).

A proliferação e diferenciação das CBC, ou ISC, é controlada por várias moléculas sinalizadoras secretadas pelo epitélio intestinal e pelas células mesenquimatosas. As moléculas que fazem parte destas vias de sinalização são o Wnt (de “wingless/integrated”) e o Notch que atuam na manutenção/diferenciação e proliferação das CBC, o fator de crescimento epidérmico (EGF), que atua na proliferação das CBC, e as proteínas morfogenéticas do osso (BMP) que atuam na diferenciação das CBC (Boonekamp et al., 2020; Date & Sato, 2015) (Figura 6).

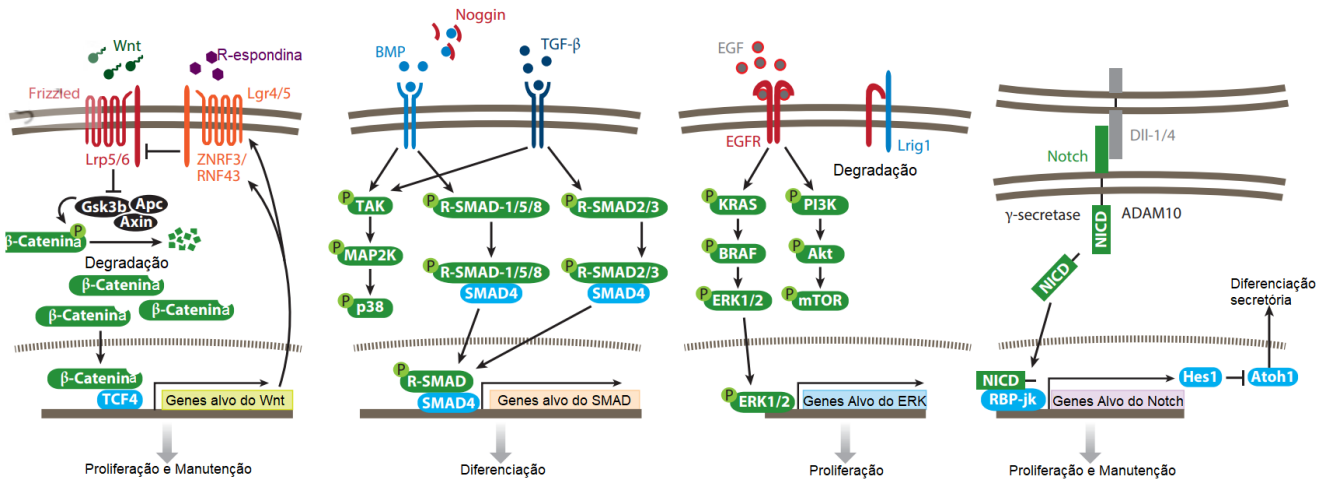


Figura 6. Vias de sinalização envolvidas na proliferação e manutenção das CBC. As vias de sinalização Wnt e Notch estão envolvidas na proliferação e manutenção das CBC. A via de sinalização BMP potencia a diferenciação das CBC nos diferentes tipos celulares encontrados no epitélio intestinal. A via de sinalização EGF potencia a proliferação das CBC. Adaptado de (Date & Sato, 2015). Permissão de utilização de imagem obtida de Copyright Clearance Center (CCC).

Dada a importância de todas estas vias de sinalização é essencial que durante a cultura dos organóides sejam adicionados fatores que atuem como agonistas/antagonistas destas vias.

2.2.2. Organóides 3D e Respetivas Monocamadas

Os organóides intestinais podem ser produzidos a partir da recolha de células intestinais, quer sejam estas ISC isoladas ou criptas que contenham ISC. Estas células, quando postas em cultura têm a capacidade de proliferarem e de se diferenciarem (Kardia et al., 2021), originando uma estrutura 3D com uma organização e capacidade funcional semelhante à que é apresentada *in vivo* (Wallach & Bayrer, 2017) (Figura 7).

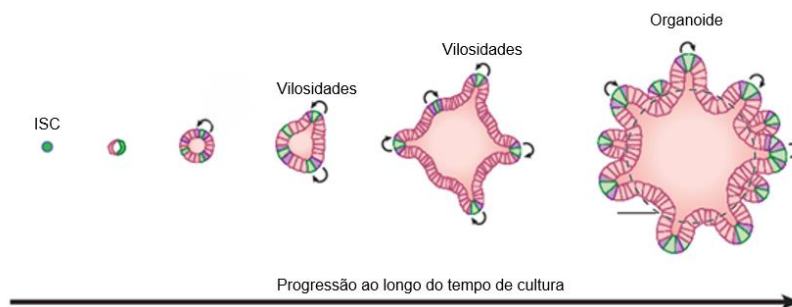


Figura 7. Desenvolvimento das ISC em organóides. Quando postas em cultura em Matrigel™ com os suplementos necessários para o desenvolvimento das células do epitélio intestinal as ISC proliferam e

diferenciam-se, formando estruturas com os vários tipos de células encontradas no intestino delgado. As vilosidades apresentam as células das criptas (ISC e células de Paneth). Os enterócitos, células enteroendócrinas e células calciformes, encontram-se na base das vilosidades dos organóides. Adaptado de (Date & Sato, 2015). Permissão de utilização de imagem obtida de Copyright Clearance Center (CCC).

Nos sistemas 3D, não existe contacto direto entre as células e a superfície. Para isto utilizam-se géis biológicos ou sintéticos que reproduzem a ECM natural. O mais usado é a Matrigel™, gerado a partir de células de sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de ratinho e composto por laminina, colagénio e outros compostos semelhantes aos do ECM. Este Matrigel™ fornece condições semelhantes às encontradas no ambiente extracelular e suporte estrutural às células.

Apesar da sua utilidade, o formato 3D dos organóides nem sempre permite o acesso dos microorganismos ao epitélio apical ou a sua movimentação ao longo deste, dificultando o estudo das interações dos microorganismos com o epitélio (Roodsant et al., 2020). Outro problema causado pela geometria dos organóides é a existência deste em vários planos o que dificulta a obtenção de imagens por microscopia convencional (Yuli Wang et al., 2017), sendo necessário recorrer à microscopia confocal. Uma forma de ultrapassar a dificuldade de acesso à zona apical é utilizar a técnica de microinjeção onde se utiliza uma agulha bastante fina para injetar diretamente na zona apical dos organóides os microorganismos pretendidos. Esta técnica, no entanto, requer um elevado nível de experiência e perícia, sendo desta forma complicada de reproduzir, limitando assim a sua utilidade (Williamson et al., 2018). Existe ainda a possibilidade de perturbar mecanicamente estas estruturas o que permite a infeção mas causa a perda da polarização e o conseqüente contacto do patógeno com ambas as zonas apicais e basolaterais (Saxena et al., 2016). Desta forma, apesar de os organóides com estrutura 3D serem bastante úteis, dependendo do tipo de investigação a ser feita pode ser necessário fazer outros tipos de cultura a partir destes.

O desdobraimento/dissociação da estrutura 3D em estruturas 2D, ou monocamadas, suportadas por colagénio é um exemplo do que pode ser feito para superar as dificuldades, pois as monocamadas apresentam a diferenciação e polarização encontrada nos organóides, permitindo a movimentação dos microorganismos ao longo das células para as várias regiões do epitélio (Luu et al., 2019; van der Hee et al., 2018).

Dado estas culturas apresentarem características relacionadas com o órgão que as originou, são um instrumento bastante útil na investigação (Corrò, Novellademunt,

& Li, 2020). Vários estudos têm utilizado os organóides e monocamadas provenientes destes para estudar as interações dos microrganismos como vírus (Crawford, Ramani, Blutt, & Estes, 2021; Zhao et al., 2021), bactérias (Han et al., 2021; Puschhof et al., 2021) e protozoários, provenientes dos tecidos que estes infetam (Barrila et al., 2018; Dutta & Clevers, 2017).

2.2.3. Organóides e Monocamadas de Intestino para Estudar Protozoários e as suas Infecções

O estudo dos protozoários e das suas interações com os tecidos que infetam tem sido largamente realizada em modelos animais ou em modelos *in vitro*. Estes modelos têm proporcionado bastantes avanços no conhecimento de muitos destes microrganismos, no entanto, trazem consigo algumas dificuldades ou problemas. A utilização de linhas celulares para estudar estas interações nem sempre representa a real situação do que acontece naturalmente, sendo o estudo feito de forma isolada ou fora do contexto biológico, não reproduzindo o ambiente natural do parasita, para além disto, as linhas celulares utilizadas nem sempre são as mais corretas dependendo do microrganismo que está a ser estudado. Desta forma, por vezes os resultados obtidos podem ser conflituosos e incertos. Por outro lado, os modelos animais são também mais caros, trabalhosos e acarretam problemas éticos (Allain & Buret, 2020; Betancourt et al., 2019; Pance, 2021).

Dado todos estes fatores, e a importância de entender melhor os mecanismos de interação parasita/hospedeiro foi necessário utilizar modelos que imitassem melhor a organização estrutural e funcional dos tecidos que os protozoários infetam, para obter interações semelhantes às que ocorrem naturalmente. Os organóides e as monocamadas provenientes destes são desta forma extremamente úteis neste tipo de estudos.

Vários estudos, usaram organóides intestinais e monocamadas provenientes destes para estudar os mecanismos patofisiológicos da infeção por *Giardia duodenalis* e os impactos que esta tem no tecido (Holthaus, Delgado-Betancourt, Aebischer, Seeber, & Klotz, 2021; Holthaus et al., 2022), outros utilizaram estes modelos para estudar o ciclo de vida completo do *Cryptosporidium parvum* e o impacto que a sua infeção tem no epitélio intestinal (Bhalchandra, Lamisere, & Ward, 2020; Heo et al., 2018).

2.2.4. Organóides e Monocamadas de Intestino para Estudar o *Toxoplasma gondii*

O estudo do ciclo de vida do *T. gondii* e das suas interações com o epitélio intestinal são muitas vezes realizadas em linhas celulares como Caco-2, provenientes de adenocarcinomas colorretais de humano. Estas células, quando comparadas a organóides de intestino ou ao epitélio intestinal in vivo, apresentam limites na sua complexidade celular. Para além disto, estas células são originárias do colon humano, enquanto o *T. gondii* normalmente tem como alvo o intestino delgado (Jones, Korcsmaros, & Carding, 2016). As linhas de cultura celulares imortalizadas, devido à acumulação de alterações genéticas e fenotípicas não simulam a fisiologia normal do epitélio intestinal. Apesar de ser possível utilizar culturas de células primárias, estas culturas são viáveis durante curtos períodos de tempo, não sendo possível estudar infeções mais longas e sendo necessárias constantes colheitas de amostras para estabelecer novas culturas primárias (Noben et al., 2017).

Desta forma, o estudo do *T. gondii* tem vindo a beneficiar bastante com a utilização de organóides intestinais e monocamadas provenientes destes, pois estes modelos apresentam funções e estruturas semelhantes ao epitélio intestinal dos hospedeiros e a capacidade de serem utilizados durante longos períodos de tempo permitindo assim a realização de várias experiências e estudos, oferecendo uma alternativa viável à utilização de linhas celulares e de modelos animais (Sutrave & Richter, 2021).

Na verdade, vários estudos utilizaram amostras de diferentes espécies para gerar organóides demonstraram que estas estruturas, incluindo as monocamadas provenientes destes, podem ser infetadas pelo parasita, possibilitando o estudo deste e dos efeitos da sua infeção no epitélio intestinal (Derricott et al., 2019; Hares et al., 2021; Pance, 2021).

Apesar da quantidade de estudos realizados para compreender o *T. gondii* e a sua infeção, os pormenores da fase sexuada têm sido difíceis de estudar devido à necessidade de utilizar gatos para realizar as experiências necessárias, desta forma os organóides são uma excelente alternativa para este tipo de estudo. Sabe-se que os felinos são a única espécie que não apresenta atividade da delta-6-dessaturase no seu intestino (Sinclair, McLean, & Monger, 1979). Esta enzima converte os ácidos gordos essenciais – alfa-linoleico e o ácido linoleico – nos seus metabolitos – EPA/DHA e ácido araquidónico, respetivamente (Brown et al., 2019).

Um estudo recente estabeleceu culturas de monocamadas provenientes de organóides de intestino de ratinho e inibiu a atividade da enzima que degrada o ácido linoleico. Concluíram que esta inibição em conjunto com a suplementação de ácido linoleico desencadeia o desenvolvimento da fase sexuada do *T. gondii* (Di Genova, Wilson, Dubey, & Knoll, 2019). Desta forma, a utilização de organóides permitiu um novo esclarecimento sobre este tema e proporcionando novas oportunidades de estudo e de desenvolvimento de técnicas para diminuir o sucesso de infecção do *T. gondii*.

No trabalho aqui apresentado, para testar a existência de desenvolvimento da fase sexuada do *T. gondii* será necessário estabelecer organóides de intestino. Serão realizados testes para confirmar que as estruturas observadas correspondem às de organóides de intestino. Um destes testes será a confirmação da existência de células específicas do epitélio intestinal, no nosso caso, enterócitos. Iremos verificar a existência de expressão do gene *Vil1*, quantificado por PCR em tempo real, como marcador de enterócitos (Kramer et al., 2020; Yoshida et al., 2020). O outro teste que será realizado será a confirmação da existência de junções apertadas, estruturas específicas do epitélio intestinal (B. Lee, Moon, & Kim, 2018), através da observação por imunofluorescência indireta da proteína zonula occludens 1 (ZO-1) – proteína específica das junções apertadas (Stevenson, Siliciano, Mooseker, & Goodenough, 1986). Será necessário estabelecer monocamadas derivadas dos organóides de intestino, pois a estrutura tridimensional dos organóides dificulta a invasão dado as células invadidas pelo *T. gondii* se encontrarem no lúmen dos organóides

Verificaremos a existência de toxicidade por parte do ácido linoleico quando a sua degradação é inibida nas células das monocamadas derivadas de organóides de intestino de ratinho e nas células HFF. Isto será verificado por microscopia ótica de campo claro, para observar a existência de células mortas (células redondas e/ou não aderidas) e alterações na invasão dos taquizoítos. Irá visualizar-se por imunofluorescência indireta as estruturas dos taquizoítos de *T. gondii*, utilizando o anticorpo policlonal anti-cofator B da tubulina do *T. gondii* (TgTBCB) e o anticorpo monoclonal anti-tubulina glutamilada (Glu). O TgTBCB é uma proteína que se localiza no pólo anterior do taquizoíto, perto do complexo apical, e tem uma função chave na invasão e na replicação do parasita (Francisco, 2020).

Finalmente, iremos testar a existência de desenvolvimento sexuado quando os taquizoítos são inoculadas em três tipos de amostras – monocamadas derivadas de organóides de intestino de gato, onde este desenvolvimento normalmente ocorre;

monocamadas derivadas de organóides de intestino de ratinho, onde se observou este desenvolvimento quando a enzima que degrada o ácido linoleico é inibida (Di Genova et al., 2019); células HFF, para testar se as elevadas concentrações de ácido linoleico despoletam este desenvolvimento em células distintas das do intestino. Para isto iremos quantificar por PCR a expressão de vários genes. Usaremos o aumento da expressão dos genes *TgMob1* e *TgLats* nas amostras suplementadas com ácido linoleico e inibidor, no caso das células de ratinho e células HFF, como marcador do desenvolvimento sexuado pois estes genes apresentam uma elevada expressão na fase sexuada quando comparado com a fase assexuada. Usaremos a expressão do gene *TgTBCB* como controlo dado a sua expressão ser semelhante nas duas fases de desenvolvimento (dados encontrados em ToxoDB.org) (I. Delgado, 2022; Francisco, 2020; Fritz et al., 2012; Ramakrishnan et al., 2019).

II. OBJETIVOS

O *T. gondii* é um parasita com uma capacidade de infecção bastante elevada, podendo causar infecção em fetos humanos. Nestes casos, o *T. gondii* pode causar cegueira, hidrocefalia e atrasos mentais graves. Sabe-se que apesar de conseguir infectar todos os mamíferos, a sua fase sexuada, vital para o seu sucesso de transmissão, só ocorre no intestino dos gatos e que esta característica ocorre devido à inatividade da delta-6-desaturase no seu intestino e consequente disponibilidade de ácido linoleico, sendo assim importante conhecer as características moleculares envolvidas neste processo. Para além disto, um estudo recente demonstrou que é possível observar o desenvolvimento da fase sexuada do *T. gondii* em monocamadas de intestino de ratinho, quando estas monocamadas são suplementadas com ácido linoleico e inibidor da delta-6-desaturase (Di Genova et al., 2019), sendo assim importante explorar a possibilidade de utilizar ratinhos como modelo alternativo aos gatos no estudo deste parasita.

Desta forma, o objetivo principal deste projeto foi estabelecer um modelo de cultura baseado em organóides de intestino de gato e de ratinho que permitissem o desenvolvimento da reprodução sexuada do *T. gondii in vitro*.

Os objetivos específicos foram:

- Estabelecer uma linha de organóides de intestino de gato e uma linha de organóides de intestino de ratinho que permitam estabelecer monocamadas derivadas destes organóides;
- Analisar por microscopia de campo claro e imunofluorescência indireta a existência de toxicidade causada pelo ácido linoleico nas células que degradam este ácido e nos taquizoítos inoculados nestas células;
- Analisar a existência de desenvolvimento sexuado dos taquizoítos quando inoculados em monocamadas derivadas de organóides de intestino de gato e de ratinho e em células HFF utilizando como marcadores deste desenvolvimento o aumento da expressão dos genes *TgMob1* e *TgLats*.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Material biológico e taquizoítos

Foram utilizados dois tipos de material biológico obtidos de modelos animais – *Felis silvestris catus* (gato) e *Mus musculus* (ratinho).

As amostras de intestino de gato foram generosamente fornecidas no seguimento da biópsia intestinal de 2 gatos acompanhados no Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária.

A amostra de intestino de ratinho foi generosamente fornecida no âmbito de um projeto de investigação da CIISA a decorrer em paralelo a este estudo.

Os taquizoítos de estirpe RH de *T. gondii* foram generosamente fornecidos pelo Professor Markus Meissner (Departamento de Ciências Veterinárias, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich).

2. Estabelecimento da linha de organóides

Relativamente aos fragmentos de intestino de gato, transferiu-se para um tubo de 50 mL com 1 X PBS (de Dulbecco's phosphate-buffered saline DPBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 1 X Penicilina/Estreptomicina (P/S) (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 50 µg/mL de Gentamicina (Gibco, Thermo Fisher Scientific) e 2,5 µg/mL de Anfotericina B (Sigma-Aldrich), estes dois últimos foram adicionadas para eliminar quaisquer infeções bacterianas ou fúngicas que as amostras tivessem à priori do manuseamento, mantido em gelo.

Relativamente às amostras de intestino de ratinho, lavou-se o interior do intestino com 1 X PBS por injeção, cortou-se longitudinalmente o intestino, repetiu-se a lavagem, cortou-se em novos segmentos de 5 mm (Derricott et al., 2019; Holthaus et al., 2021) e transferiu-se os fragmentos para um tubo de 50 mL com 1 X PBS suplementado com 1 X P/S, mantido em gelo.

Ambos os fragmentos de intestino foram lavados com agitação 20-40 rpm, durante 20-30 minutos. A dissociação celular foi realizada adicionando EDTA (Sigma-Aldrich) a 0,2 mM e agitando a baixa velocidade (20rpm) durante 40 minutos. Deixou-se os fragmentos assentarem. Descartou-se a solução de dissociação e lavou-se os

fragmentos com 1 X PBS suplementado com antibiótico P/S, para retirar o EDTA. Descartou-se e adicionou-se cerca de 1,5 mL de 1 X PBS suplementado com antibiótico P/S e ressuspendeu-se a amostra usando a mesma pipeta para desagregar os fragmentos existentes sem que estes ficassem presos às paredes da pipeta. Centrifugou-se durante 10 minutos a 8 °C e 300 g. Descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se até os fragmentos estarem desfeitos. Adicionou-se 10 mL de meio 1 X Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12 (Advanced DMEM/F12) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) frio, agitou-se vigorosamente e pipetou-se para cima e para baixo várias vezes para libertar as criptas. Transferiu-se as criptas para um novo tubo de 50 mL usando um filtro de 70 µm (Derricott et al., 2019; Di Genova et al., 2019). Repetiu-se a centrifugação e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 5 mL de meio Advanced DMEM/F12 frio e ressuspendeu-se. Repetiu-se a centrifugação e o descarte do sobrenadante. Adicionou-se meio de organóides de ratinho ou de gato, ambos suplementados com Meio Condicionado obtido da linha celular L-WRN (CRL 3276), (Tabela 3.1) ao precipitado e ressuspendeu-se para realizar a contagem das células. Transferiu-se as células, após ressuspensão em 50 µL de meio para um tubo de 1,5 mL previamente preparado com 100 µL de Matrigel™ (Corning Life Sciences) (Di Genova et al., 2019), descongelada em gelo para evitar a sua polimerização precoce (Baghdadi & Kim, 2022), ficando uma proporção final de células/ Matrigel™ de 1:2. Homogeneizou-se as células com a Matrigel™ e pipetou-se gotas de 45 µL numa placa de 6 poços a 37 °C, para dar início à polimerização da Matrigel™, e consequentemente estabilização. Deixou-se as gotas assentar e estabilizar e virou-se a placa para que as gotas estivessem viradas para baixo e solidificassem numa estrutura mais tridimensional. A placa foi transferida para a estufa húmida a 37 °C com 5% CO₂, durante 5-10 minutos para a Matrigel™ polimerizar/solidificar (Holthaus et al., 2021). Adicionou-se 2 mL de meio de organóides a cada poço. Transferiu-se a placa para a estufa húmida a 37 °C com 5 % CO₂. As células foram diariamente observadas com um microscópio ótico invertido e todas as fotografias foram obtidas desta observação usando a câmara de telemóvel.

Tabela 3.1. Concentrações/proporções finais dos compostos utilizados no meio de organóide

Compostos	Concentração/ Proporção final	Ratinho	Gato
Advanced DMEM/F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific)	1:1	X	X
Meio Condicionado obtido da linha celular L-WRN (CRL 3276)	1:1	X	X
GlutaMax 100X (Gibco, Thermo Fisher Scientific)	2 mM	X	X
HEPES 1M (Gibco, Thermo Fisher Scientific)	20 mM	X	X
B27 50X (Gibco, Thermo Fisher Scientific)	1 X	X	X
N2 100X (Gibco, Thermo Fisher Scientific)	1 X	X	X
P/S 100X (Gibco, Thermo Fisher Scientific)	1 X	X	X
Nicotinamida (Sigma-Aldrich)	10 mM	X	X
CHIR99021 (Sigma-Aldrich)	3 μ M	X	X
Y27632 (Tocris Bioscience)	10 μ M	X	X
EGF (Peprotech, Thermo Fisher Scientific)	50 ng/mL	X	X
Anfotericina B (Sigma-Aldrich)	2,5 μ g/mL		X
Gentamicina (Gibco, Thermo Fisher Scientific)	50 μ g/mL		X

3. Passagem de organóides

Descartou-se o meio antigo e lavou-se com 1 X PBS frio. Adicionou-se 1 mL de 0,05 % Tripsina-EDTA 1 X (Gibco, Thermo Fisher Scientific) e incubou-se na estufa a 37 °C durante 5 minutos. Utilizou-se uma pipeta de 1000 μ L com uma ponta de 10 μ L encaixada na ponta de 1000 μ L para desagregar a Matrigel™ e os organóides. Adicionou-se 2 mL de meio Advanced DMEM/F12 frio para desativar a tripsina e continuou-se o processo de desagregação dos organóides usando a pipeta. Transferiu-se o conteúdo dos poços para um tubo de 15 mL. Pipetou-se 2 mL de meio Advanced

DMEM/F12 frio para cada poço, ressuspendeu-se e transferiu-se para o tubo de 15 mL. Centrifugou-se durante 5 minutos a 8 °C a 300 g. Descartou-se o sobrenadante. Pipetou-se 5mL de meio Advanced DMEM/F12 frio e ressuspendeu-se o precipitado. Repetiu-se a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se meio até toda a Matrigel™ ser removida (Derricott et al., 2019; O'Rourke, Ackerman, Dow, & Lowe, 2016). Adicionou-se 300 µL de meio de organóide de ratinho ou gato (Tabela 3.1) e ressuspendeu-se o precipitado. Reservou-se em gelo uma proporção de 4:5 de meio com células e pipetou-se os restantes 1:5 de meio de organóide com células para um tubo de 1,5 mL previamente preparado com 300 µL de Matrigel™, descongelado em gelo evitar a sua polimerização precoce, ficando uma proporção final de células/Matrigel™ de 1:5. Homogeneizou-se as células com a Matrigel™ e pipetou-se gotas de 45 µL numa placa de 6 poços a 37 °C, para dar início à polimerização da Matrigel™, e conseqüentemente estabilização. Deixou-se as gotas assentar e estabilizar e virou-se a placa para que as gotas estivessem viradas para baixo e solidificassem numa estrutura mais tridimensional. A placa foi transferida para a estufa húmida a 37 °C com 5 % CO₂, durante 5-10 minutos para a Matrigel™ polimerizar/solidificar (Holthaus et al., 2021). Adicionou-se 2 mL de meio de organóides a cada poço. Transferiu-se a placa para a estufa húmida a 37 °C com 5 % CO₂. As células foram diariamente observadas com um microscópio ótico invertido e todas as fotografias foram obtidas desta observação usando a câmara de telemóvel.

4. Estabelecimento das monocamadas

Revestiu-se os poços de uma placa de 6 poços e de uma placa de 24 poços (com lamelas de vidro) com Colagénio Tipo 1, Cauda de Rato (Ibidi) diluído em 17.5 mM de ácido acético (0,1 %) e deixou-se a repousar durante 1 hora à temperatura ambiente (In, Foulke-Abel, Clarke, & Kovbasnjuk, 2019; Roodsant et al., 2020). Aspirou-se o excesso de colagénio dos poços e lavou-se com 1 X PBS para polimerizar o colagénio. Descartou-se o PBS.

As células utilizadas para o estabelecimento das monocamadas foram sempre obtidas durante o procedimento de passagem dos organóides. Pipetou-se os restantes 4:5 de células ressuspendidas em 300 µL de meio de organóide que não foram ressuspendidas em Matrigel para os vários poços. Adicionou-se 2 mL de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com GlutaMAX (Gibco, Thermo Fisher

Scientific) e com 10 % de Soro de Bovino Fetal (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) a cada poço. Transferiu-se a placa para a estufa húmida a 37 °C com 5 % CO₂ e observou-se as células diariamente utilizando um microscópio ótico invertido. As células foram diariamente observadas com um microscópio ótico invertido e várias fotografias foram obtidas desta observação usando a câmara de telemóvel.

5. Cultura e passagem de células HFF e de taquizoítos

A linha de células HFF-1 (American Type Culture Collection, ATCC) (de “Human foreskin fibroblasts”) foi cultivada em monocamadas subconfluentes em meio DMEM suplementado com GlutaMAX (Gibco, Thermo Fisher Scientific) e com 10 % de FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Para passar as células HFF descartou-se o meio antigo de uma placa de 60 cm², lavou-se duas vezes com 5 mL de 1 X PBS, pipetou-se 1 mL de Tripsina-EDTA, removeu-se o excesso e incubou-se durante 5 minutos a 37 °C. Ressuspendeu-se em 4mL de meio cultura e pipetou-se para placas de 60 cm² na proporção de 1:2 ou para frascos T25 (25 cm²) na proporção de 1:4. Transferiu-se para a estufa húmida a 37 °C com 5 % CO₂ até que as células atingissem a confluência nas placas. Os frascos de T25 foram mantidos confluentes para serem inoculados com *T. gondii* (I. L. S. Delgado et al., 2021; Khan & Grigg, 2017).

Os taquizoítos de *T. gondii*, estirpe RH, foram cultivados em T25 com células HFF confluentes em meio DMEM suplementado com 10 % de FBS, e mantidos através de consecutivas passagens (Khan & Grigg, 2017).

6. Experiências com ácido linoleico e o inibidor da enzima que o degrada

6.1. Testes das concentrações de ácido linoleico e do inibidor da enzima que o degrada

Testou-se diferentes concentrações de ácido linoleico (0,2 mM, 0,1 mM e 0,05 mM; Sigma-Aldrich) e do inibidor da enzima que degrada o ácido linoleico (SC-26196) (20 µM, 10 µM e 5 µM; Sigma-Aldrich) em células HFF cultivadas em placas de 24 poços com lamelas de vidro e infetadas com *T. gondii* durante 24 e 48 horas e observou-se as células por microscopia ótica de campo claro. De seguida as células foram analisadas por imunofluorescência indireta (ver ponto 8) para avaliar se havia algum efeito de toxicidade (alteração de estrutura, morte celular e diferenças na replicação do parasita). As imagens foram obtidas de um microscópio Leica DMR, com objetivas de 60x e

câmara Leica DFC340FX. As imagens foram adquiridas utilizando o software Photoshop e processadas usando o software ImageJ (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012).

6.2. Experiência para analisar a expressão de genes relacionados com a fase sexuada

Após o ensaio acima descrito (5.1), realizou-se a experiência para a extração de RNA em células HFF cultivadas em 3 frascos T25, com 20 µM de Inibidor (SC-26196) e 0,2 mM de Ácido Linoleico e outros 3 frascos T25 com células HFF com 20 mM de DMSO. Inoculou-se em cada frasco T25 taquizoítos e incubou-se os frascos T25 na estufa húmida a 37 °C com 5 % CO₂, durante 24 horas. Repetiu-se o ensaio, alterando o tempo de invasão dos taquizoítos para 48 horas.

O ensaio das 24 horas foi repetido utilizando monocamadas provenientes dos organóides de intestino de ratinho mantidas em meio DMEM suplementado com 10 % de FBS. Estas monocamadas foram suplementadas com 20 µM de Inibidor (SC-26196) e 0,2 mM de Ácido Linoleico (Di Genova et al., 2019) ou suplementadas com 20 mM de DMSO e inoculadas com taquizoítos.

Após o período de incubação, realizou-se a extração de RNA (ver ponto 6).

7. Extração e quantificação de RNA

Extraíu-se o RNA dos organóides, das células do intestino e das experiências realizadas em 5.2:

- a) Recolheu-se as células dos organóides repetindo o procedimento descrito na passagem de organóides (ponto 2) para obter o precipitado de células.
- b) Para recolher as células de intestino, lavou-se e dissociou-se os fragmentos como previamente explicado. Centrifugou-se os fragmentos desfeitos durante 10 minutos a 8 °C e 300 g para gerar o precipitado.
- c) Recolheu-se os *T. gondii* inoculados em células HFF suplementados com ácido linoleico e inibidor (SC-26196) e DMSO, raspando a superfície dos frascos T25 com um raspador para libertar as células e os taquizoítos da superfície do frasco (Khan & Grigg, 2017). Transferiu-se o meio com células e taquizoítos para tubos de 50 ml e centrifugou-se durante 10 minutos a 1146 g a 20 °C. Descartou-se o

sobrenadante, adicionou-se 2 mL de 1 X PBS e repetiu-se a centrifugação duas vezes. Descartou-se o sobrenadante, secando bem o precipitado.

- d) Recolheu-se os *T. gondii* inoculados em monocamadas de organóides suplementados com ácido linoleico e inibidor (SC-26196) e DMSO aspirando o meio para dois tubos de 1,5 mL para recuperar os taquizoítos livres. Centrifugou-se os tubos durante 10 minutos a 1146 g a 20 °C. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o precipitado com 1 X PBS e transferiu-se o conteúdo do primeiro tubo para outro tubo. Repetiu-se a centrifugação e lavagem com 1 X PBS. Para recuperar os taquizoítos intracelulares lavou-se os poços com 1 X PBS duas vezes e adicionou-se 350 µL de TRK Lysis Buffer (Omega Bio-Tek) a cada poço. Lavou-se os poços com os 350 µL de tampão e transferiu-se para o tubo de 1,5 mL onde estava o precipitado dos taquizoítos livres centrifugados.

Realizou-se a extração de RNA total usando o E.Z.N.A.® TOTAL RNA KIT I (Omega Bio-Tek) e seguindo as recomendações do fabricante.

A quantificação dos RNA foi efetuada utilizando o Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000 c.

8. Síntese de cDNA e PCR em tempo real

Realizou-se a síntese de cDNA usando Firescript RT cDNA Synthesis Mix with Oligo (dt) and Random Primers (Solis BioDyne), seguindo as instruções do fabricante. Para as amostras de intestino, organóides e monocamadas derivadas dos organóides analisou-se a existência de expressão do gene *Vil1* (Sirakov, Borra, Cambuli, & Plateroti, 2013) como marcador dos enterócitos para confirmar a sua existência e a expressão do gene *Hprt1* (Batista et al., 2020), como controlo interno, para normalizar a expressão de *Vil1*. Nos taquizoítos utilizou-se o aumento da expressão dos genes *TgMob1* e *TgLats* como marcadores do desenvolvimento sexuado e a expressão do gene *TgTbcb* como controlo dado este ser expresso de forma semelhante nas duas fases de desenvolvimento (I. Delgado, 2022; Francisco, 2020; Fritz et al., 2012; Ramakrishnan et al., 2019). Utilizou-se como controlo interno a expressão do gene *TgGadph* para normalizar a expressão de *TgMob1*, *TgLats* e *TgTbcb*. As sequências dos primers utilizados encontram-se descritas na Tabela 3.2 (Batista et al., 2020; I. Delgado, 2022; Sirakov et al., 2013).

Tabela 3.2. Primers utilizados no PCR em tempo real

Gene Alvo	Primer forward	Primer Reverse
<i>Vil1</i>	TGGAGGAGGAGGATGTGTTC	GGGTCTCAAGGTCTCGGTTT
<i>Hprt1</i>	GTCGTGATTAGCGATGATGAACC	GCAAGTCTTTCAGTCCTGTCCATA
<i>TgLats</i>	GGCAAATCGTGATGAGCGAC	ATCTCCCTGAGCGAACCTCT
<i>TgTbcb</i>	AACTACATTGCGCCATCGGCA	GACCGTCTGTACACCCCAAG
<i>TgMob1</i>	CTGCCACATCTACAGACAAC	GAGTGGTACGGAGACAATG
<i>TgGapdh</i>	CGTGGAGGTTTTGGCGATC	GACTTCGCCGGGGTAGTG

O PCR em tempo real foi realizado usando PerfeCTa SYBR Green SuperMix com ROX no sistema Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems). A quantificação da expressão relativa foi calculada com base na reta standard obtida com amostras triplicadas diluídas de 1:5. Para estudar a expressão de *Vil1* utilizaram-se duplicados das amostras, enquanto, para estudar a expressão de *TgLats*, *TgTbcb* e de *TgMob1* utilizaram-se triplicados das amostras.

9. Imunofluorescência indireta

Colocou-se lamelas em 12 poços de placas de 24 poços. Colocou-se células HFF em seis desses poços e manteve-se as células em meio DMEM suplementado com 10 % de FBS, dentro da estufa húmida a 37 °C com 5 % CO₂ até estarem confluentes. As células de cada dois poços foram tratadas com 20 µM de inibidor em DMSO, 0,2 mM de ácido linoleico e inoculados com *T. gondii* após 24 horas de tratamento. As células controlo foram tratadas com 20 mM de DMSO e inoculadas com *T. gondii* após 24 horas de tratamento ou não tiveram qualquer tratamento. Repetiu-se o procedimento nos restantes 6 poços, alterando apenas o tipo de células utilizadas – monocamadas provenientes de organóides.

Para fixar as células descartou-se o meio, lavou-se 2 vezes com 1 X PBS e fixou-se com 200 µL de metanol frio (-20 °C) (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos. Repetiu-se as lavagens com 1 X PBS. Reservou-se em 1X PBS a -4 °C até ser realizada a imunofluorescência (I. L. S. Delgado et al., 2021; Saxena et al., 2016).

Descartou-se o PBS e incubou-se com 300 µL de solução de bloqueio (3% de albumina sérica bovina (BSA) (MilliporeSigma) em PBS) durante 15 minutos. Descartou-se a solução de bloqueio e incubou-se em 30 µL da diluição do anticorpo primário feita na solução de bloqueio durante 1 hora (Tabela 3.3). Lavou-se duas vezes com 1 X PBS e uma vez com 1 X PBS 0.1 % Tween 20 (Merck). Incubou-se em 30 µL da diluição do anticorpo secundário feita na solução de bloqueio durante 30 minutos (Tabela 3.3). Repetiu-se as lavagens com 1 X PBS e montou-se as lamelas nas lâminas. O DNA foi corado devido à presença de DAPI no meio de montagem utilizado – Fluoromount-G com DAPI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) (I. L. S. Delgado et al., 2021). As imagens foram obtidas de um microscópio Leica DMR, com objetivas de 60 x e câmara Leica DFC340FX. As imagens foram adquiridas utilizando o software Photoshop e processadas usando o software ImageJ (Schneider et al., 2012). Os anticorpos utilizados estão representados na Tabela 3.3 (I. Delgado, 2022; Di Genova et al., 2019; Francisco, 2020)

Tabela 3.3. Anticorpos utilizados na imunofluorescência

Anticorpo	Espécie	Diluição	Origem
Monoclonal anti-actina	Coelho	1:50	Sigma-Aldrich
Policlonal anti-TgTBCB	Coelho	1:50	In house
Monoclonal anti-tubulina glutamilada (Glu)	Ratinho	1:100	Adipogen
Monoclonal anti-ZO-1	Rato	1:100	Santa Cruz
Alexa Fluor 488-conjugada anti-ratinho IgG	Cabra	1:500	Invitrogen
Alexa Fluor 594-conjugada anti-coelho IgG	Galinha	1:500	Invitrogen

10. Testes estatísticos

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa estatístico R Studio. Nos resultados do PCR em tempo real testou-se a existência de diferenças significativas entre as expressões relativas de cada gene utilizando o teste paramétrico T-student e o teste não paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon para duas amostras independentes. Consideraram-se os valores de $p < 0,05$ significativos.

11. Considerações ético-legais

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa e conseqüentemente aprovado CE-ESTeSL-Nº 40-2021.

IV. RESULTADOS

1. Estabelecimento da linha de organóides e monocamadas

As amostras de intestino de felino foram obtidas de dois gatos diferentes – A e B. O gato A apresentava uma idade próxima a 9 anos enquanto que o gato B apresentava 10 anos. Ambos apresentavam sintomas intestinais e gástricos que levaram à realização de uma biópsia. Os fragmentos utilizados foram obtidos a partir destas biópsias.

As células obtidas do fragmento A foram postas em cultura e ao fim de dois dias observou-se um crescimento lento das células. Ao fim de cinco dias foi possível observar uma aparente contaminação. Para tentar controlar esta situação foram adicionados 2,5 µg/mL de Anfotericina B e 50 µg/mL de Gentamicina. Estes foram ineficientes e foi necessário descartar esta amostra. Decidiu-se assim, nas próximas amostras, adicionar Anfotericina B e Gentamicina ao PBS utilizado durante as lavagens das amostras e ao meio utilizado para cultivar os organóides.

As células obtidas do fragmento B foram observadas por microscopia ótica não havendo proliferação algum das criptas, mantendo-se apenas o aspeto observado no primeiro dia de cultura (Figura 8).

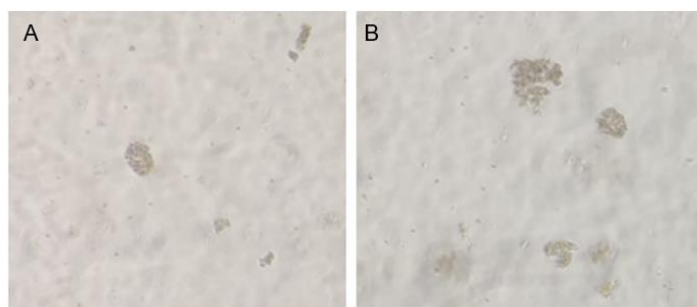


Figura 8. Células obtidas do gato B, 0 e 4 dias em cultura. A observação das células foi feita por microscopia ótica de campo claro. (A) Células imediatamente após inoculação, dia 0; (B) Crescimento das células ao fim de 4 dias. Apesar de ser possível observar agregados celulares em ambos os tempos de cultura, não houve proliferação celular, nem a consequente formação de organóides. A imagem não apresenta barra de escala pois as fotografias foram obtidas por microscopia ótica de campo claro, usando a objetiva de 60X e câmara do telemóvel.

Devido à dificuldade em obter novas amostras de gato, e às que existirem serem provenientes de gatos de idade avançada e doentes, conjuntamente com a incapacidade de estabelecer organóides a partir dessas mesmas amostras, decidiu-se utilizar amostras de intestino de ratinho com menos de 8 semanas de idade. As

amostras utilizadas foram obtidas a partir de animais sacrificados no âmbito de outros projetos de investigação a decorrer no laboratório.

Nas amostras de ratinho, foi possível observar por microscopia ótica de campo claro uma imediata diferença na quantidade de células e agregados celulares existentes (Figura 9A) comparativamente às observadas nas amostras de intestino de gato. Estas células para além de existirem em maior quantidade, demonstraram um rápido crescimento e proliferação, tendo-se observado a formação de pequenas estruturas com algumas protuberâncias (Figura 9B; Figura 9C) ao fim de 4 dias de cultura. Este desenvolvimento manteve-se constante e ao fim de 6 dias as estruturas previamente observadas apresentavam numerosas vilosidades (Figura 9D).

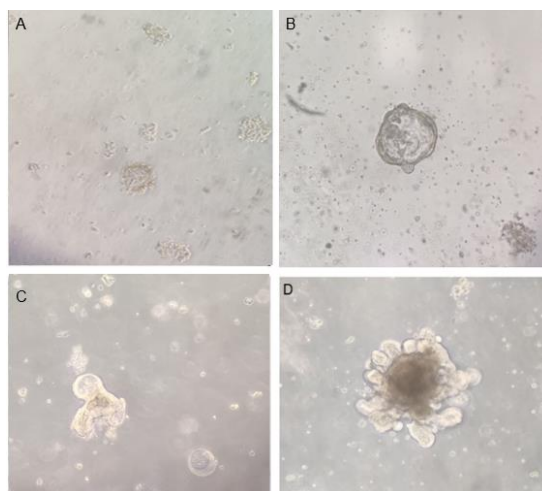


Figura 9. Desenvolvimento das criptas obtidas da amostra de ratinho em organóides. A observação das células foi feita por microscopia ótica de campo claro. (A) Após inoculação, dia 0; (B) Após 2 dias em cultura; (C) Após 4 dias em cultura; (D) Após 6 dias em cultura. Ocorreu proliferação celular por parte das criptas e formação de estruturas esféricas com vilosidades (organóides). A imagem não apresenta barra de escala pois as fotografias foram obtidas por microscopia ótica de campo claro, usando a objetiva de 20X e câmara do telemóvel.

Utilizando os organóides de intestino de ratinho foi possível estabelecer culturas de monocamadas. Foi possível, observar por microscopia ótica de campo claro, várias células aderidas ao colagénio 24 horas após terem sido postas em cultura (Figura 10B), no entanto, nos dias seguintes não se observou proliferação por parte das células que aderiram ao colagénio.

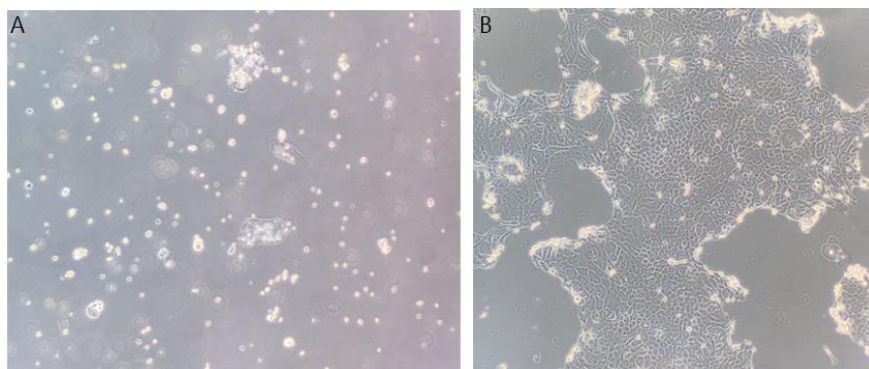


Figura 10. Monocamadas estabelecidas a partir dos organóides de intestino de ratinho. A observação das células foi feita por microscopia ótica de campo claro. (A) Imediatamente após inoculação; (B) 24 horas após inoculação. Observou-se aderência ao colagénio por parte das células ao fim de 24 horas de inoculação, no entanto, não se observou proliferação por parte das mesmas, nos dias seguintes. A imagem não apresenta barra de escala pois as fotografias foram obtidas por microscopia ótica de campo claro, usando a objetiva de 20X e câmara do telemóvel

Apesar das monocamadas de intestino não terem crescido nem atingido confluência, as células que aderiram foram utilizadas para realizar as experiências seguintes.

Foi necessário confirmar que as estruturas observadas se tratavam de facto de organóides de intestino de ratinho e monocamadas derivadas destes. Esta confirmação pôde ser realizada através da confirmação da existência de células específicas do epitélio intestinal, neste caso enterócitos, nestas amostras. Realizou-se um PCR em tempo real para analisar a existência de expressão do gene *Vil1*, sendo esta marcadora da existência de enterócitos nas amostras. Utilizou-se como controlo interno a expressão do gene *Hprt1* para normalizar a expressão do *Vil1*. O controlo interno permitiu corrigir as variações e erros existentes na quantificação da expressão do gene alvo de cada amostra (Hruz et al., 2011). Utilizou-se amostras de intestino como controlo positivo da amplificação, dado sabermos que neste tipo de amostra existem enterócitos e, como esperado, verificou-se a existência de expressão do gene *Vil1*.

Verificou-se a existência de expressão do gene *Vil1* nas amostras de organóides e nas amostras de monocamadas (Figura 11), indicando assim a presença de enterócitos nestas amostras. Porém, ficou a faltar um controlo negativo de células que não expressam o gene *Vil1*, para validar a especificidade da baixa expressão do gene nas amostras de organóides de intestino de ratinho e de monocamadas derivadas destes.

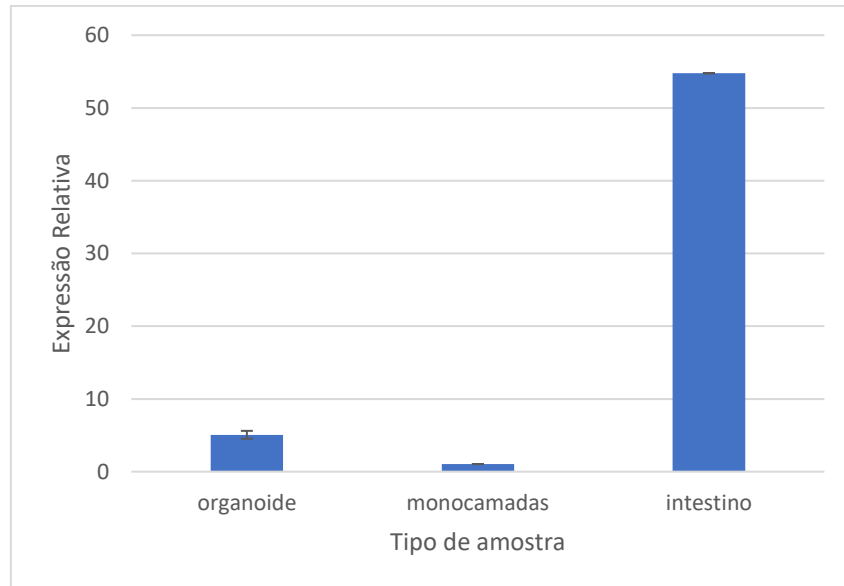


Figura 11. Expressão relativa de *Vil1* nas amostras de organóides, monocamadas e intestino de ratinho. Observou-se expressão do gene *Vil1* por parte de todas as amostras. Está representada a expressão relativa \pm S.D (barras de erro) do gene *Vil1*. Os valores da expressão de *Vil1* foram normalizados utilizando a expressão do gene *Hprt1*.

1.1. Análise da presença de junções apertadas nas monocamadas provenientes dos organóides

Também é possível testar se as estruturas observadas se tratavam de organóides de intestino e de monocamadas derivadas destes através da confirmação da existência das junções apertadas. Estas são estruturas específicas do epitélio intestinal. Esta confirmação pôde ser realizada através da observação das proteínas ZO-1 específicas das junções apertadas, por imunofluorescência indireta.

Para isto passou-se as células dos organóides para poços de placas de 24, com lamelas de vidro e previamente revestidos com colagénio e deixou-se que estas aderissem ao colagénio. Porém, ao contrário do que aconteceu nas placas de 6 poços poucas destas células aderiram ao colagénio, e as que aderiram foram perdidas durante o processamento da imunofluorescência. Este processo foi repetido, no entanto, sempre sem sucesso, possivelmente devido à má aderência das células ao colagénio.

2. Análise do efeito do ácido linoleico e do inibidor nas células HFF e nos taquizoítos

2.1. Análise do efeito do ácido linoleico e do inibidor nas células HFF e nos taquizoítos por microscopia ótica de campo claro

Foi realizado um ensaio para testar se existia toxicidade para as células HFF ou para os taquizoítos, quando as células HFF eram suplementadas com diferentes concentrações de ácido linoleico e de inibidor (SC-26196). Dado não terem sido observados, por microscopia ótica de campo claro, indícios de morte celular – células redondas e células não aderidas – utilizaram-se nos ensaios seguintes as concentrações máximas testadas – 20 μM de inibidor (SC-26196) dissolvido em DMSO e 0,2 mM de ácido linoleico.

Repetiu-se a observação por microscopia ótica de campo claro das células HFF suplementadas com 20 μM de inibidor (SC-26196) e 0,2 mM de ácido linoleico e inoculadas com taquizoítos ao fim de 24 horas (teste) e das células HFF suplementadas com 20 mM de DMSO e inoculadas com taquizoítos ao fim de 24 horas (controlo) (Figura 12), para confirmar os resultados previamente obtidos. Mais uma vez, não foi possível detetar indícios de morte celular, diferenças na densidade celular ou aparentes diferenças na capacidade de invasão dos taquizoítos.

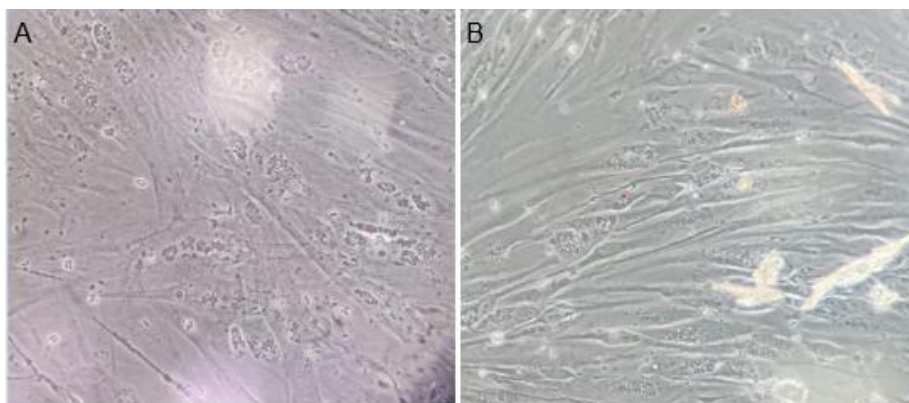


Figura 12. Efeito do ácido linoleico e inibidor (SC-26196) em células HFF ao fim de 24 horas de invasão por *T. gondii*. A observação das células foi feita por microscopia ótica de campo claro. (A) Células HFF suplementadas com 20mM de DMSO e inoculadas com *T. gondii* – controlo; (B) Células HFF suplementadas com 20mM de Ácido Linoleico, 20 μM de Inibidor (SC-26196) e inoculadas com *T. gondii* – teste. Não são observáveis diferenças na densidade celular, indícios de morte celular (células redondas e células não aderidas), ou aparentes diferenças na invasão dos taquizoítos, entre as amostras controlo e teste. A imagem não apresenta barra de escala pois as fotografias foram obtidas por microscopia ótica de campo claro, usando a objetiva de 60X e câmara do telemóvel.

Realizou-se esta mesma observação microscópica para as amostras ao fim de 48 horas após invasão dos taquizoítos (Figura 13) e tal como anteriormente, não foi possível detetar indícios aparentes de morte celular, como células redondas e não aderidas, diferenças na densidade celular ou aparentes diferenças na capacidade de invasão dos taquizoítos.

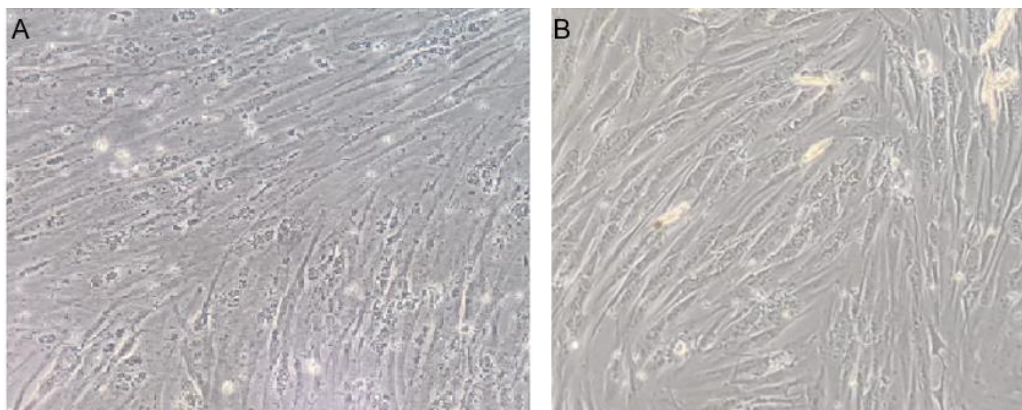


Figura 13. Efeito do ácido linoleico e inibidor (SC-26196) em células HFF ao fim de 48 horas de invasão por *T. gondii*. A observação das células foi feita por microscopia ótica de campo claro. (A) Células HFF suplementadas com 20mM de DMSO e inoculadas com *T. gondii* – controlo; (B) Células HFF suplementadas com 20mM de Ácido Linoleico, 20µM de Inibidor (SC-26196) e inoculadas com *T. gondii* – teste. Não são observáveis diferenças na densidade celular, indícios de morte celular (células redondas e células não aderidas), ou aparentes diferenças na invasão dos taquizoítos, entre as amostras controlo e teste. A imagem não apresenta barra de escala pois as fotografias foram obtidas por microscopia ótica de campo claro, usando a objetiva de 60X e câmara do telemóvel

2.2. Análise do efeito do ácido linoleico e do inibidor nas células HFF e nos taquizoítos por microscopia de fluorescência – imunofluorescência indireta

Após avaliado o efeito da suplementação do ácido linoleico e do inibidor (SC-26196) sobre os taquizoítos intracelulares por microscopia ótica de campo claro, realizou-se uma análise de imunofluorescência indireta para observar as estruturas celulares dos taquizoítos, inoculados em células HFF, após 24 horas de tratamento e 24 horas de invasão. As células foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-tubulina glutaminada (GLU) para visualização do complexo apical, das células filhas e do citoesqueleto de tubulina glutamílica, com meio de montagem com DAPI para visualização dos núcleos e com o anticorpo policlonal anti-cofator B da tubulina (TBCB) para visualização do polo anterior, mais especificamente das zonas junto ao conóide e

junto ao anel polar apical (Francisco, 2020), dado estas serem importantes na invasão (Figura 14).

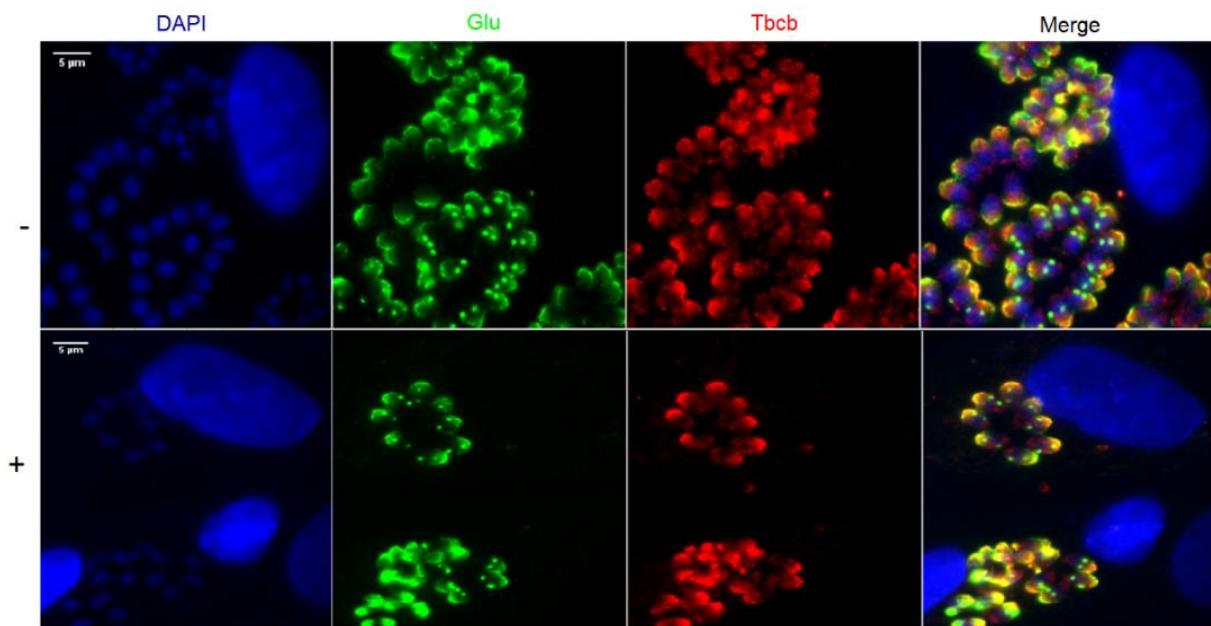


Figura 14. Efeito do ácido linoleico e inibidor (SC-26196) nos taquizoítos. Célula HFF suplementada com ácido linoleico e inibidor (SC-26196) (+) ou suplementadas com DMSO (-) durante 24 horas e inoculadas com taquizoítos após este período. Ao fim de 24 horas de invasão dos taquizoítos processou-se a imunofluorescência. Utilizou-se o meio de montagem Fluoromount-G com DAPI para visualizar o núcleo dos taquizoítos, o anticorpo monoclonal anti-tubulina glutaminada (GLU) para visualizar o citoesqueleto de tubulina, o complexo apical e as células filhas e o anticorpo policlonal anti-cofator B da tubulina (TBCB) para visualizar o polo anterior. Não se observou diferenças estruturais significativas, nem alterações na replicação ativa dos taquizoítos entre as amostras (+) e (-). Estes resultados são equivalentes entre as duas amostras, indicando que a presença de ácido linoleico e inibidor (SC-26196) não causaram alterações significativas no ciclo lítico do parasita.

Foi possível observar por imunofluorescência indireta que os taquizoítos inoculados em células HFF suplementadas com ácido linoleico e inibidor não aparentaram apresentar diferenças estruturais significativas, quando comparados com os taquizoítos inoculados em células HFF não suplementadas. A existência de duas células filhas no interior dos taquizoítos em replicação sugere também, que houve replicação assexuada destes. Estes resultados são equivalentes entre as amostras teste – suplementadas com ácido linoleico e inibidor (SC-26196) – e as amostras controle, indicando que a presença de ácido linoleico e de inibidor (SC-26196) não causaram alterações significativas no ciclo lítico do parasita.

3. Análise do efeito do ácido linoleico e inibidor na expressão de genes da fase sexuada do parasita

3.1. Análise do efeito do ácido linoleico e inibidor na expressão de genes da fase sexuada do parasita quando inoculados em células HFF

Após confirmação de que o ácido linoleico e o inibidor (SC-26196) não causam morte celular dos taquizoítos intracelulares, nem alterações no seu ciclo lítico, analisou-se este tratamento seria capaz de causar a diferenciação dos taquizoítos na fase sexuada em células HFF.

Quantificou-se, para amostras recolhidas 24 e 48 horas após invasão dos taquizoítos, através de PCR em tempo real a expressão dos genes *TgMob1* e *TgLats* e *TgTBCB*. Utilizou-se como marcador do desenvolvimento sexuada o aumento da expressão dos genes *TgMob1* e *TgLats* nas amostras teste comparativamente às amostras controlo, dado estes apresentarem uma expressão aumentada na fase sexuada. Por outro lado, utilizou-se a expressão do gene *TgTbcb* como controlo dado este apresentar uma expressão semelhantes nas duas fases de desenvolvimentos (dados encontrados em ToxoDB.org) (I. Delgado, 2022; Francisco, 2020; Fritz et al., 2012; Ramakrishnan et al., 2019). Normalizou-se a expressão destes genes utilizando como controlo interno a expressão do gene *Gapdh* para normalizar a expressão dos genes alvo. O controlo interno permitiu corrigir as variações e erros existentes na quantificação da expressão dos genes alvo de cada amostra (Hruz et al., 2011).

Após análise estatística não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0.05$) na expressão dos genes *TgLats*, *TgMob1* e *TgTbcb* dos taquizoítos após 24 horas de invasão entre controlo e tratamento com ácido linoleico e inibidor da atividade da enzima que o degrada (teste) (Figura 15).

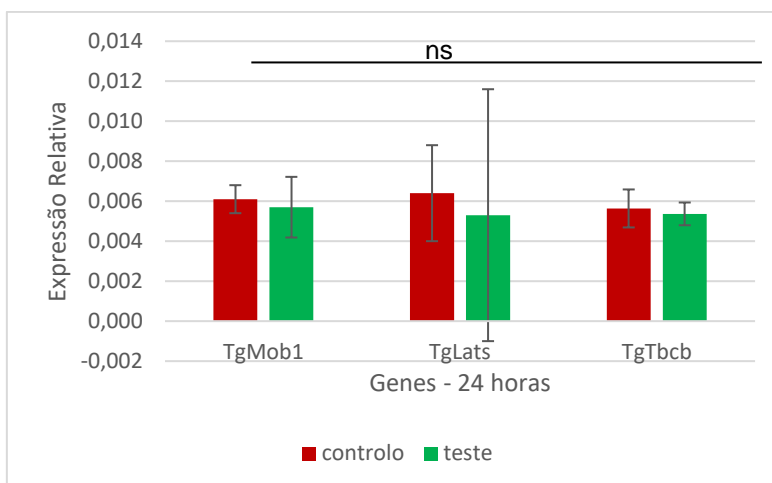


Figura 15. Análise da expressão relativa de *TgMob1*, *TgLats* e *TgTbcb* em taquizoítos após 24h de invasão. As células HFF foram suplementadas com ácido linoleico e Inibidor (SC-26196) (teste) ou com DMSO (controle). Os *T. gondii* foram recolhidos após 24 horas de invasão. Não existiram diferenças significativas entre as amostras controle e teste para nenhum dos genes estudados, indicando que não houve desenvolvimento da fase sexuada do ciclo de vida. Está representada a expressão relativa \pm S.D (barras de erro) dos genes de 3 experiências independentes. Os valores da expressão dos genes analisados foram normalizados utilizando a expressão do gene *Gapdh*. ns – valores de p não significativos

Por outro lado, nas amostras de 48 horas verificou-se que existiu uma diminuição significativa ($p < 0.05$) na expressão dos genes *TgMob1* e *TgLats* nas amostras teste quando comparadas com as controle. Tal como esperado, não se observou diferenças significativas na expressão do gene *TgTbcb* (Figura 16).

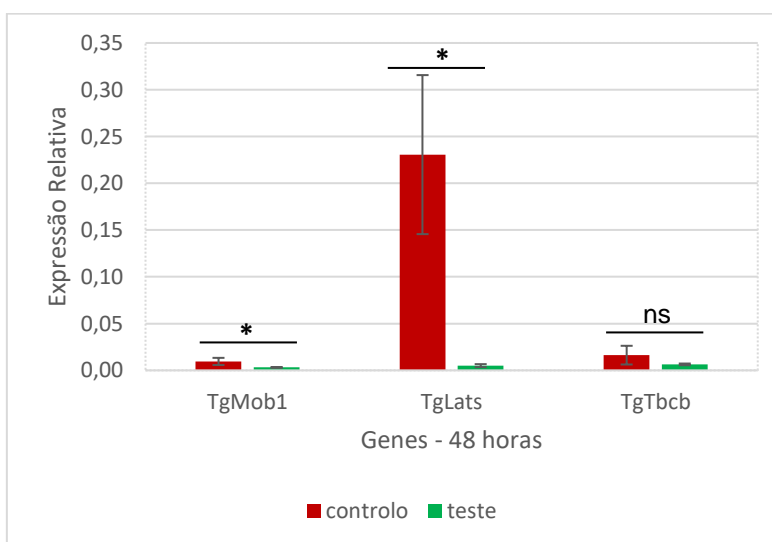


Figura 16. Análise da expressão relativa de *TgMob1*, *TgLats* e *TgTbcb* em taquizoítos após 48h de invasão. As células HFF foram suplementadas com ácido linoleico e Inibidor (SC-26196) (teste) ou com DMSO (controle). Os *T. gondii* foram recolhidos após 48 horas de invasão. Verificou-se uma diminuição significativa ($p < 0.05$) na expressão dos genes *TgLats* e *TgMob1* nas amostras teste comparativamente às amostras controle, por outro lado, não se observou diferenças significativas na expressão do gene *TgTbcb*. Estes resultados indicam que não existiu desenvolvimento da fase sexuada do ciclo de vida em nenhuma das

amostras. Está representada a expressão relativa \pm S.D (barras de erro) dos genes de 3 experiências independentes. Os valores da expressão dos genes analisados foram normalizados utilizando a expressão do gene *Gapdh*. ns – valores de p não significativos, * $p < 0,05$.

Estes resultados sugerem que não existiu desenvolvimento da fase sexuada do *T. gondii* em nenhuma das amostras analisadas, pois não foi observado aumento da expressão dos genes *TgMob1* e *TgLats* em nenhuma das amostras teste.

3.2. Análise do efeito do ácido linoleico e inibidor na expressão de genes da fase sexuada do parasita quando inoculados em monocamadas provenientes de organóides intestinais

Testou-se a existência de desenvolvimento da fase sexuada quando os taquizoítos foram inoculados em monocamadas provenientes de organóides de intestino de ratinho. Observou-se os taquizoítos por microscopia ótica de campo claro e verificou-se que não ocorreu aparentes diferenças na morte celular ou na capacidade de invasão dos taquizoítos entre as amostras teste e controlo (Figura 17).

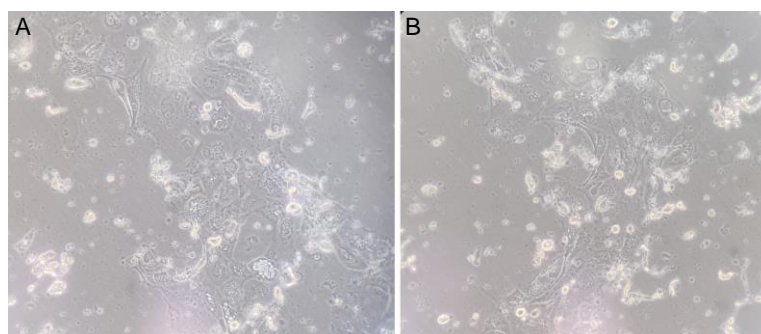


Figura 17. Efeito do ácido linoleico e inibidor (SC-26196) em monocamadas provenientes de organóides de intestino ao fim de 24 horas pós invasão com *T. gondii*. A observação das células foi feita por microscopia ótica de campo claro. (A) Monocamadas provenientes de organóides intestinais suplementadas com 20 mM de DMSO e inoculadas com *T. gondii* – controlo; (B) Monocamadas provenientes de organóides intestinais suplementadas com 20 mM de Ácido Linoleico, 20 μ M de Inibidor (SC-26196) dissolvido em DMSO e inoculadas com *T. gondii* – teste. Não se verificou diferenças na morte células ou na capacidade de invasão dos taquizoítos, entre as amostras controlo e teste. A imagem não apresenta barra de escala pois as fotografias foram obtidas por microscopia ótica de campo claro, usando a objetiva de 60X e câmara do telemóvel

Quantificou-se por PCR em tempo real a expressão dos genes *TgMob1*, *TgLats* e *TgTbcB* de taquizoítos inoculados em monocamadas de intestino de ratinho e normalizou-se a sua expressão utilizando como controlo interno a expressão do gene *Gapdh* (Figura 18). Verificou-se que existiu uma diminuição significativa na expressão

do gene *TgMob1* nas amostras teste quando comparadas com as amostras controlo. Não se verificou diferenças significativas na expressão dos genes *TgLats* e *TgTcb*, sendo no caso deste último gene o resultado esperado, entre as amostras controlo e teste. Dado não ter sido observado aumento da expressão dos genes *TgMob1* e *TgLats* nas amostras teste, os taquizoítos não aparentam ter iniciado a fase sexuada do ciclo de vida.

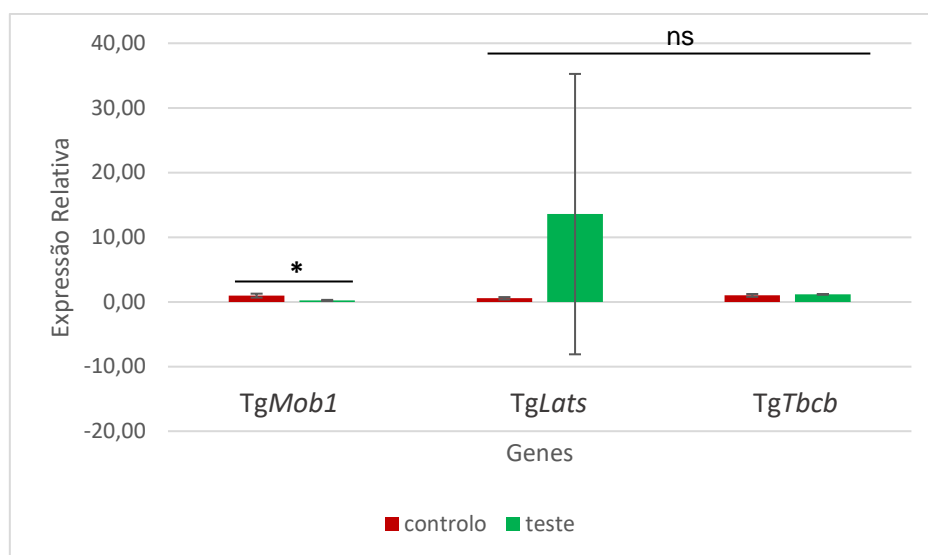


Figura 18. Análise da expressão relativa de *TgMob1*, *TgLats* e *TgTcb* em taquizoítos. As monocamadas de intestino de ratinho foram suplementadas com ácido linoleico e Inibidor (SC-26196) (teste) ou com DMSO (controlo). Os *T. gondii* foram recolhidos após 24 horas de invasão. Verificou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na expressão do gene *TgMob1* nas amostras teste comparativamente às amostras controlo, por outro lado, não se observou diferenças significativas nas expressões dos genes *TgLats* e *TgTcb*. Estes resultados indicam que não existiu desenvolvimento da fase sexuada do ciclo de vida em nenhuma das amostras. Está representada a expressão relativa \pm S.D dos genes de 3 experiências independentes. Os valores da expressão dos genes analisados foram normalizados utilizando a expressão do gene *Gapdh*. ns – valores de p não significativos, * $p < 0,05$.

V. DISCUSSÃO

É possível estabelecer linhas de organóides intestinais, estruturas funcionalmente e estruturalmente semelhantes ao intestino *in vivo*, utilizando amostras de intestino que contenham ISC com elevada expressão de *Lgr5* (Sato et al., 2009). Estas ISC ao proliferarem dão origem a estruturas esféricas, que com a continua diferenciação das ISC noutros tipos celulares encontrados no epitélio intestinal *in vivo*, começam a exibir pequenas protuberâncias (Derricott et al., 2019; Navis et al., 2019; Sato et al., 2009). Desta forma, e ao longo do tempo, os organóides começam a exibir

cada vez mais protuberâncias que começam a assemelhar-se às vilosidades do intestino, onde é possível encontrar ISC e células de Paneth.

Os organóides podem ser estabelecidos a partir de amostras biológicas de várias espécies, entre eles os gatos (Di Genova et al., 2019; Tekes, Ehmann, Boulant, & Stanifer, 2020), no entanto, as amostras de gato utilizadas neste estudo não demonstraram proliferação nem formação das estruturas esperadas. Os estudos previamente mencionados utilizaram amostras obtidas de secções de intestino delgado fetal (Di Genova et al., 2019), ou de gatos muito jovens criados em laboratório (Tekes et al., 2020), por outro lado, neste estudo utilizámos amostras de intestino de doadores de idade avançada e doentes. Estudos indicam que o fator idade tem influência na capacidade de proliferação das ISC e na capacidade de expressão de genes específicos das ISC como o *Lgr5* em criptas *in vivo* (Nalapareddy et al., 2017). *In vitro*, vários estudos demonstram que criptas envelhecidas, obtidas de humanos ou ratinhos não proliferam o suficiente para formar organóides ou se proliferarem formam um número bastante reduzido de organóides quando comparados com organóides estabelecidos de ISC jovens. Estes organóides também não apresentam as mesmas capacidades de diferenciação encontradas em organóides estabelecidos a partir de ISC jovens (Nalapareddy, Hassan, Sampson, Zheng, & Geiger, 2021; Nalapareddy et al., 2017; Pentimikko et al., 2019). Desta forma, a idade avançada dos doadores pode ter causado a incapacidade de estabelecer a linha de organóides. Dado este estudo ter sido realizado utilizando amostras de gatos acompanhados no Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, como forma de reduzir o uso de animais de experimentação e aliviar as questões éticas relativas à experimentação animal, a disponibilidade das amostras utilizadas esteve dependente da necessidade de intervenções cirúrgicas nestes animais. Este fator não só influenciou o número de amostras disponíveis, mas também a qualidade destas, no entanto, dado termos achado importante não utilizar animais que não necessitassem de intervenções médicas decidimos acartar este risco.

Em paralelo, utilizou-se, também, amostras de intestino de ratinho para estudar o desenvolvimento sexuado do *T. gondii* (Di Genova et al., 2019). Diferente do que ocorreu com as amostras de gato, as células obtidas das amostras de ratinho demonstraram a proliferação esperada, tendo sido possível observar por microscopia ótica estruturas com vilosidades ao fim de poucos dias de cultura. Apesar da aparência dos organóides dar indícios de que não só existiu proliferação das ISC mas também

diferenciação foi necessário tentar confirmar a existência de outros tipos celulares, em especial os enterócitos, dado ser nestas células que ocorre o desenvolvimento do fase sexuada do parasita *T. gondii*. Para este fim, realizou-se um PCR em tempo real que confirmou a existência da expressão do gene *Vil1*, gene específico de enterócitos, sugerindo assim, a conseqüente existência de enterócitos nas células dos organóides.

Apesar da utilidade dos organóides, a sua organização estrutural dificulta a infecção por parte do *T. gondii*, tendo sido necessário estabelecer uma linha de monocamadas provenientes destes. Utilizou-se colagénio como suporte estrutural para estas células (Luu et al., 2019). Foi possível observar por microscopia ótica, várias células aderidas ao colagénio ao fim de 24 horas de cultura. Estas monocamadas, no entanto, não demonstraram proliferação celular, podendo inferir-se que não ocorreu proliferação das ISC. Estes resultados estão de acordo com os obtidos noutros estudos, que tal como nós estabeleceram monocamadas mas não observaram ganho de confluência destas (Altay et al., 2019; Thorne et al., 2018), no entanto, também vão contra os resultados de estudos que observaram crescimento das monocamadas (Kozuka et al., 2017; Nickerson et al., 2021) Apesar disto, as monocamadas utilizadas aparentaram expressar *Vil1*, sugerindo a existência de enterócitos.

Para além de necessitarem de apresentar as células encontradas no tecido *in vivo* as monocamadas provenientes de organóides intestinais precisam também de manter a sua polarização e as suas junções apertadas características do epitélio intestinal (Kozuka et al., 2017). Esta polarização e formação de junções apertadas pode ser analisada através da imunofluorescência, mais especificamente da observação da proteína específica das junções apertadas ZO-1. Apesar de ter sido possível estabelecer monocamadas em placas de 6 poços, o mesmo não aconteceu em placas de 24 poços contendo lamelas de vidro, não tendo sido possível confirmar se as monocamadas apresentavam junções apertadas.

O *T. gondii* efetua a sua fase sexuada nos enterócitos do intestino de gatos e um estudo recentemente realizado demonstrou que este desenvolvimento está relacionado com os altos níveis de ácido linoleico encontrados neste local, causados pela inexistência da enzima delta-6-dessaturase que degrada o ácido linoleico, no intestino dos gatos. Este estudo demonstrou que inoculando bradizoítos em monocamadas derivadas de organóides de ratinhos suplementados com ácido linoleico e inibidor da atividade da enzima delta-6-dessaturase, estes bradizoítos conseguiam diferenciar-se em esquizontes e dar início à fase sexuada normalmente apenas observada em gatos

(Di Genova et al., 2019). Desta forma colocou-se a hipótese de que utilizando monocamadas provenientes de organóides intestinais de ratinho, que expressam genes específicos dos enterócitos, suplementadas com ácido linoleico e inibidor (SC-26196), o parasita apresentasse indícios de desenvolvimento sexuado. Dada a importância do ácido linoleico neste ciclo, foi também importante testar se altas concentrações deste eram suficientes para induzir a fase sexuada em células diferentes dos enterócitos.

As células HFF, são células utilizadas em laboratório para o cultivo de taquizoítos. Durante o estabelecimento dos organóides e monocamadas, realizou-se nestas células os primeiros ensaios com o ácido linoleico e inibidor (SC-26196) não só como um pré-teste para testar se estes tinham efeitos tóxicos para os taquizoítos e células HFF, nas concentrações utilizadas, mas também como forma de testar se esta suplementação poderia causar o desenvolvimento da fase sexuada do ciclo por parte dos taquizoítos, mesmo em células em que isto não ocorre naturalmente.

Observou-se por microscopia ótica de campo claro células HFF suplementadas com várias concentrações de ácido linoleico e inibidor (SC-26196) e inoculadas com taquizoítos, sendo que a concentração mais elevada já tinha sido utilizada num outro estudo com sucesso (Di Genova et al., 2019). Não se detetou diferenças entre as células HFF e taquizoítos expostos ao ácido linoleico e inibidor (SC-26196) e não expostos. Desta forma, os ensaios seguintes foram realizados com as concentrações mais elevadas.

A análise por imunofluorescência indireta, utilizando o anticorpo policlonal anti-TgTbcb e monoclonal anti-tubulina glutamilada, permitiu detetar em ambas as amostras as estruturas esperadas, importantes estas para o processo de invasão, foi ainda possível observar duas células filhas no interior dos taquizoítos, indicando que os taquizoítos estavam a dividir-se por endodiogenia (Ferguson & Dubremetz, 2013). Esta replicação por parte dos taquizoítos sugere que não existiram alterações na replicação assexuada, dado as replicações encontradas nas fases de desenvolvimento pertencentes à fase sexuada do ciclo de vida serem a esquizogonia – característica da formação de esquizontes e merozoítos – e a gametogénese – característica da formação de micro e macrogâmetas (J. P. Dubey, 2017; Sanchez & Besteiro, 2021).

Apesar destes resultados indicarem que não existiu desenvolvimento da fase sexuada dos taquizoítos realizou-se análises por PCR em tempo real para quantificar a expressão dos genes *TgTbcb*, *TgMob1* e *TgLats*, dado estes dois últimos apresentarem baixa expressão na fase assexuada mas elevada expressão na fase sexuada, servindo

assim o seu aumento de expressão nas amostras testes como marcador de desenvolvimento sexuado (dados encontrados em ToxoDB.org) (I. Delgado, 2022; Fritz et al., 2012; Ramakrishnan et al., 2019). Quando comparada a expressão relativa destes genes concluiu-se que nas amostras de 24 horas não existiram diferenças significativas entre as amostras controlo e teste, não existindo assim desenvolvimento da fase sexuada do ciclo de vida, pois se este desenvolvimento tivesse ocorrido teríamos observado um aumento significativo na expressão dos genes *TgMob1* e *TgLats* nas amostras teste. Por outro lado, nas amostras de 48 horas observou-se que a expressão dos genes *TgMob1* e *TgLats* estavam significativamente diminuídas nas amostras teste quando comparadas com as amostras controlo demonstrando que também não existiu desenvolvimento da fase sexuada nestas amostras. Estes resultados foram inesperados pois no caso de inexistência de desenvolvimento sexuado esperávamos observar a inexistência de diferenças significativas na expressão destes dois genes entre as amostras teste e controlo, tal como ocorreu nas amostras de 24 horas. Dado esta diminuição não ter sido observada nas amostras de 24 horas não é possível confirmar se a suplementação feita poderá afetar negativamente a expressão destes genes em células HFF. Independentemente disto, estes resultados indicam que a presença do ácido linoleico, apesar de extremamente importante para o desenvolvimento sexuado, não despoletou este desenvolvimento quando o parasita estava a infetar células diferentes dos enterócitos, sugerindo que para além das elevadas concentrações de ácido linoleico, serão também necessários fatores relacionados com o ambiente intestinal.

Realizou-se esta mesma experiência em monocamadas provenientes de organóides de intestino de ratinho suplementadas com ácido linoleico e com inibidor (SC-26196) durante 24 horas. Inoculou-se os taquizoítos nestas células durante 24 horas. Realizou-se a extração de RNA, sintetizou-se o cDNA e realizou-se vários PCR em tempo real para quantificar a expressão de *TgMob1*, *TgLats* e *TgTbcb*. Observou-se uma diminuição significativa na expressão do gene *TgMob1* nas amostras teste comparativamente às amostras controlo. O mesmo não foi observado na expressão do gene *TgLats*, não havendo diferenças significativas na sua expressão entre as amostras estudadas. Desta forma, tal como ocorreu nas células HFF, concluiu-se que não houve indícios de desenvolvimento da fase sexuada.

Estes resultados, diferentes dos conseguidos no estudo de Di Genova e colegas podem ser devidos a várias diferenças entre ambos os estudos. Di Genova e colegas

inocularam as monocamadas com bradizoítos e sabe-se que os bradizoítos se diferenciam em esquizontes dando assim início à fase sexuada (Peng, Tan, & Lindsay, 2015), no entanto, não existem estudos que refiram que os taquizoítos apresentem esta mesma capacidade de diferenciação em esquizontes, sendo assim possível que seja necessária ocorrer primeiramente a diferenciação dos taquizoítos em bradizoítos e só depois a diferenciação destes em esquizontes. Outro fator que pode ter afetado os resultados obtidos neste estudo é o tempo de exposição do parasita ao ácido linoleico e inibidor (SC-26196). No estudo de Di Genova e colegas, os bradizoítos foram expostos ao ácido linoleico e inibidor (SC-26196) durante 5 dias, enquanto no nosso estudo, a exposição foi de apenas 1 dia, podendo este tempo não ter sido suficiente para os taquizoítos se diferenciarem em esquizontes, caso esta diferenciação exista. Outro fator que poderá ter afetado a inexistência de desenvolvimento da fase sexuada do ciclo foi o próprio inibidor (SC-26196). Apesar de não se ter observado nenhuma toxicidade nas células ou nos taquizoítos não realizamos nenhum controle para confirmar que o inibidor (SC-26196) estava a ter o efeito esperado. Quando o ácido linoleico e inibidor (SC-26196) eram suplementados no meio, observou-se também formação de cristais, que podem ter comprometido a biodisponibilidade quer dos suplementos quer de um dos componentes do meio em que as células e *T. gondii* se encontravam. Desta forma, é possível que tenha existido um comprometimento na inibição da enzima que degrada o ácido linoleico e parte deste tenha sido degradado, não havendo assim concentrações suficientes de ácido linoleico nas células para que os taquizoítos se diferenciassem na fase sexuada do ciclo.

V. CONCLUSÃO

Foi possível estabelecer uma linha de organóides de intestino de ratinho. Estes organóides apresentaram a aparência observada noutros estudos – forma esférica com várias vilosidades – e existência de enterócitos, permitiram também estabelecer monocamadas intestinais. Infelizmente, não foi possível, confirmar a existência de polaridade e junções apertadas nas monocamadas através da imunofluorescência. Apesar disto, estas monocamadas foram suplementadas com ácido linoleico e inibidor (SC-26196) e infetadas com taquizoítos, com sucesso, permitindo realizar os ensaios para analisar a expressão de genes característicos da fase sexuada. Concluiu-se que não houve desenvolvimento da fase sexuada do ciclo de vida.

Foram inoculados taquizoítos em células HFF suplementadas com ácido linoleico e inibidor (SC-26196). Estas amostras permitiram confirmar que o ácido linoleico e inibidor (SC-26196), quando em contacto com os taquizoítos durante 24 horas, não causam alterações na sua estrutura, capacidade de invasão e replicação assexuada. Permitiu também a confirmação que o ácido linoleico não despoleta o desenvolvimento sexuado quando o parasita está a infetar células diferentes dos enterócitos.

Dado os resultados obtidos, retirando as questões éticas que necessitariam de uma cuidadosa análise, seria de valor científico repetir este estudo, com vários tempos de exposição ao ácido linoleico, utilizando organóides de intestino de gatos jovens para estabelecer monocamadas e infetar estas com taquizoítos, pois dado ser no intestino dos gatos que fase sexuada do ciclo de vida do *T. gondii* ocorre *in vivo*, isto permitiria entender se os taquizoítos apresentam a capacidade de se diferenciarem nas fases sexuadas ou se este desenvolvimento só acontece com bradizoítos. Seria também importante voltar a estabelecer as monocamadas provenientes de intestino de ratinho e desta vez infetar as monocamadas com bradizoítos, para observar se existe ou não diferenciação nas fases sexuadas e conseqüente desenvolvimento deste ciclo.

VII.BIBLIOGRAFIA

- Allain, T., & Buret, A. G. (2020). Pathogenesis and post-infectious complications in giardiasis. *Advances in Parasitology*, 107, 173–199. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.12.001>
- Altay, G., Larrañaga, E., Tosi, S., Barriga, F. M., Batlle, E., Fernández-Majada, V., & Martínez, E. (2019). Self-organized intestinal epithelial monolayers in crypt and villus-like domains show effective barrier function. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46497-x>
- Arisue, N., & Hashimoto, T. (2015). Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. *Parasitology International*, 64(3), 254–259. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.10.005>
- Attias, M., Teixeira, D. E., Benchimol, M., Vommaro, R. C., Crepaldi, P. H., & De Souza, W. (2020). The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04445-z>
- Baghdadi, M. B., & Kim, T. H. (2022). Analysis of mouse intestinal organoid culture with conditioned media isolated from mucosal enteric glial cells. *STAR Protocols*, 3(2), 101351. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101351>
- Barbosa, H. S., Munoz, R. M. De, & Moura, M. D. A. (2014). O Ciclo Evolutivo. In *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.
- Barrila, J., Crabbé, A., Yang, J., Franco, K., Nydam, S. D., Forsyth, R. J., ... Nickerson, C. A. (2018). Modeling host-pathogen interactions in the context of the microenvironment: Three-dimensional cell culture comes of age. *Infection and Immunity*, 86(11), 1–28. <https://doi.org/10.1128/IAI.00282-18>
- Batista, M. R., Diniz, P., Torres, A., Murta, D., Murta, D., Lopes-Da-Costa, L., & Silva, E. (2020). Notch signaling in mouse blastocyst development and hatching. *BMC Developmental Biology*, 20(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12861-020-00216-2>
- Berry, M. N., & Friend, D. S. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *The Journal of Cell Biology*, 43(3), 506–520. <https://doi.org/10.1083/jcb.43.3.506>
- Betancourt, E. D., Hamid, B., Fabian, B. T., Klotz, C., Hartmann, S., & Seeber, F. (2019). From entry to early dissemination-*Toxoplasma gondii*'s Initial Encounter with Its

- Host. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(MAR), 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00046>
- Bhalchandra, S., Lamisere, H., & Ward, H. (2020). Intestinal organoid/enteroid-based models for *Cryptosporidium*. *Current Opinion in Microbiology*, 58, 124–129.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.10.002>
- Bissell, D. M., & Tilles, J. G. (1971). MORPHOLOGY AND FUNCTION EMBRYONIC OF CELLS OF HUMAN CULTURE LIVER IN MONOLAYER. *The Journal of Cell Biology*, 50(1), 222–231.
- Blader, I. J., Coleman, B. I., Chen, C. T., & Gubbels, M. J. (2015). Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 463–485. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>
- Blader, I. J., & Koshy, A. A. (2014). *Toxoplasma gondii* development of its replicative niche: In its host cell and beyond. *Eukaryotic Cell*, 13(8), 965–976.
<https://doi.org/10.1128/EC.00081-14>
- Boonekamp, K. E., Dayton, T. L., & Clevers, H. (2020). Intestinal organoids as tools for enriching and studying specific and rare cell types: advances and future directions. *Journal of Molecular Cell Biology*, 12(8), 562–568.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjaa034>
- Bougdour, A., Tardieux, I., & Hakimi, M. A. (2014). *Toxoplasma* exports dense granule proteins beyond the vacuole to the host cell nucleus and rewires the host genome expression. *Cellular Microbiology*, 16(3), 334–343.
<https://doi.org/10.1111/cmi.12255>
- Brown, K. M., Sharma, S., Baker, E., Hawkins, W., van der Merwe, M., & Puppa, M. J. (2019). Delta-6-desaturase (FADS2) inhibition and omega-3 fatty acids in skeletal muscle protein turnover. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 18(October 2018), 100622. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100622>
- Cerutti, A., Blanchard, N., & Besteiro, S. (2020). The bradyzoite: A key developmental stage for the persistence and pathogenesis of toxoplasmosis. *Pathogens*, 9(3), 1–21. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030234>
- Cheng, W., Liu, F., Li, M., Hu, X., Chen, H., Pappoe, F., ... Shen, J. (2015). Variation detection based on next-generation sequencing of type Chinese 1 strains of

- Toxoplasma gondii with different virulence from China. *BMC Genomics*, 16(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2106-z>
- Corrò, C., Novellademunt, L., & Li, V. S. W. (2020). A brief history of organoids. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 319(1), C151–C165. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2020>
- Crawford, S. E., Ramani, S., Blutt, S. E., & Estes, M. K. (2021). Organoids to dissect gastrointestinal virus–host interactions: What have we learned? *Viruses*, 13(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/v13060999>
- Date, S., & Sato, T. (2015). Mini-Gut Organoids: Reconstitution of the Stem Cell Niche. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 31(September), 269–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125218>
- Delgado, I. (2022). *Unraveling the replication process of toxoplasma gondii through the mob1 protein*. [Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária]. <http://hdl.handle.net/10400.5/24486>
- Delgado, I. L. S., Tavares, A., Francisco, S., Santos, D., Coelho, J., Basto, A. P., ... Nolasco, S. (2021). Characterization of a mob1 homolog in the apicomplexan parasite toxoplasma gondii. *Biology*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/biology10121233>
- Delgado, I. L. S., Zúquete, S., Santos, D., Basto, A. P., Leitão, A., & Nolasco, S. (2022). The Apicomplexan Parasite Toxoplasma gondii. *Encyclopedia*, 2(1), 189–211. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010012>
- Derricott, H., Luu, L., Fong, W. Y., Hartley, C. S., Johnston, L. J., Armstrong, S. D., ... Coombes, J. L. (2019). Developing a 3D intestinal epithelium model for livestock species. *Cell and Tissue Research*, 375(2), 409–424. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2924-9>
- Di Genova, B. M., Wilson, S. K., Dubey, J. P., & Knoll, L. J. (2019). Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for Toxoplasma sexual reproduction. *PLoS Biology*, 17(8), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000364>
- Dubey, J. P. (2017). Schizogony and gametogony of oocyst-deficient T-263 strain of Toxoplasma gondii. *Veterinary Parasitology*, 245, 160–162. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.024>

- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 267–299. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.2.267>
- Dubey, Jitender P. (2013). The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods: Second Edition* (Second Edi). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396481-6.00001-5>
- Dubois, D. J., & Soldati-Favre, D. (2019). Biogenesis and secretion of micronemes in *Toxoplasma gondii*. *Cellular Microbiology*, 21(5), 1–14. <https://doi.org/10.1111/cmi.13018>
- Dubremetz, J. F. (1998). Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. *Trends in Microbiology*, 6(1), 27–30.
- Dutta, D., & Clevers, H. (2017). Organoid culture systems to study host–pathogen interactions. *Current Opinion in Immunology*, 48, 15–22.
- Fell, H. B., & Robison, R. (1929). The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb-buds cultivated in vitro. *Biochemical Journal*, 23(4), 767–784. <https://doi.org/10.1042/bj0230767>
- Ferguson, D. J. P., & Dubremetz, J. F. (2013). The Ultrastructure of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods: Second Edition* (Second Edi). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396481-6.00002-7>
- Fong, C. -J, Sherwood, E. R., Sutkowski, D. M., Abu-Jawdeh, G. M., Yokoo, H., Bauer, K. D., ... Lee, C. (1991). Reconstituted basement membrane promotes morphological and functional differentiation of primary human prostatic epithelial cells. *The Prostate*, 19(3), 221–235. <https://doi.org/10.1002/pros.2990190304>
- Francisco, S. (2020). *Toxoplasma gondii Tubulin Cofactor B plays a key role in host cell invasion and replication*. [Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária]. <http://hdl.handle.net/10400.5/20149>
- Frénal, K., Dubremetz, J. F., Lebrun, M., & Soldati-Favre, D. (2017). Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. *Nature Reviews Microbiology*, 15(11), 645–660. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.86>

- Frenkel, J. K. (1973). Toxoplasma In and Around Us. *BioScience*, 23(6), 343–352.
- Fritz, H. M., Buchholz, K. R., Chen, X., Durbin-Johnson, B., Rocke, D. M., Conrad, P. A., & Boothroyd, J. C. (2012). Transcriptomic analysis of toxoplasma development reveals many novel functions and structures specific to sporozoites and oocysts. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029998>
- Gassler, N. (2017). Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 8(4), 150–160. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v8.i4.150>
- Graindorge, A., Frénel, K., Jacot, D., Salamun, J., Marq, J. B., & Soldati-Favre, D. (2016). The Conoid Associated Motor MyoH Is Indispensable for Toxoplasma gondii Entry and Exit from Host Cells. *PLoS Pathogens*, 12(1), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005388>
- Grün, D., Muraro, M. J., Boisset, J. C., Wiebrands, K., Lyubimova, A., Dharmadhikari, G., ... van Oudenaarden, A. (2016). De Novo Prediction of Stem Cell Identity using Single-Cell Transcriptome Data. *Cell Stem Cell*, 19(2), 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.05.010>
- Hadfield, S. J., & Guy, E. C. (2021). Toxoplasmosis. In *Medicine (United Kingdom)* (Vol. 49). <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2021.09.009>
- Han, X., Mslati, M. A., Davies, E., Chen, Y., Allaire, J. M., & Vallance, B. A. (2021). Creating a More Perfect Union: Modeling Intestinal Bacteria-Epithelial Interactions Using Organoids. *Cmgh*, 12(2), 769–782. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.04.010>
- Hares, M. F., Tiffney, E. A., Johnston, L. J., Luu, L., Stewart, C. J., Flynn, R. J., & Coombes, J. L. (2021). Stem cell-derived enteroid cultures as a tool for dissecting host-parasite interactions in the small intestinal epithelium. In *Parasite Immunology* (Vol. 43). <https://doi.org/10.1111/pim.12765>
- Harrison, R. G., Greenman, M. J., Mall, F. P., & Jackson, C. M. (1907). Observations of the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record*, 1(5), 116–128. <https://doi.org/10.1002/ar.1090010503>
- Heo, I., Dutta, D., Schaefer, D. A., Iakobachvili, N., Artegiani, B., Sachs, N., ... Clevers, H. (2018). Modelling Cryptosporidium infection in human small intestinal and lung

- organoids. *Nature Microbiology*, 3(7), 814–823. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0177-8>
- Hill, D. E., & Dubey, J. P. (2018). *Toxoplasma gondii*. *Foodborne Parasites*, 119–138. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-67664-7>
- Holthaus, D., Delgado-Betancourt, E., Aebischer, T., Seeber, F., & Klotz, C. (2021). Harmonization of Protocols for Multi-Species Organoid Platforms to Study the Intestinal Biology of *Toxoplasma gondii* and Other Protozoan Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(February), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.610368>
- Holthaus, D., Kraft, M. R., Krug, S. M., Wolf, S., Müller, A., Delgado Betancourt, E., ... Klotz, C. (2022). Dissection of Barrier Dysfunction in Organoid-Derived Human Intestinal Epithelia Induced by *Giardia duodenalis*. *Gastroenterology*, 162(3), 844–858. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.11.022>
- Hruz, T., Wyss, M., Docquier, M., Pfaffl, M. W., Masanetz, S., Borghi, L., ... Zimmermann, P. (2011). RefGenes: Identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC Genomics*, 12(1), 156. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-156>
- In, J. G., Foulke-Abel, J., Clarke, E., & Kovbasnjuk, O. (2019). Human colonoid monolayers to study interactions between pathogens, commensals, and host intestinal epithelium. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(146), 1–11. <https://doi.org/10.3791/59357>
- Jones, E. J., Korcsmaros, T., & Carding, S. R. (2016). Mechanisms and pathways of *Toxoplasma gondii* transepithelial migration. *Tissue Barriers*, 5(1), 1–29.
- Kardia, E., Frese, M., Smertina, E., Strive, T., Zeng, X. L., Estes, M., & Hall, R. N. (2021). Culture and differentiation of rabbit intestinal organoids and organoid-derived cell monolayers. *Scientific Reports*, 11(1), 5401. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84774-w>
- Kato, K. (2018). How does *Toxoplasma gondii* invade host cells? *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(11), 1702–1706. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0344>
- Khan, A., & Grigg, M. E. (2017). *Toxoplasma gondii*: Laboratory maintenance and growth. *Current Protocols in Microbiology*, 2017, 20C.1.1-20C.1.17.

<https://doi.org/10.1002/cpmc.26>

- Kozuka, K., He, Y., Koo-McCoy, S., Kumaraswamy, P., Nie, B., Shaw, K., ... Siegel, M. (2017). Development and Characterization of a Human and Mouse Intestinal Epithelial Cell Monolayer Platform. *Stem Cell Reports*, 9(6), 1976–1990. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.10.013>
- Kramer, N., Pratscher, B., Meneses, A. M. C., Tschulenck, W., Walter, I., Swoboda, A., ... Burgener, I. A. (2020). Generation of Differentiating and Long-Living Intestinal Organoids Reflecting the Cellular Diversity of Canine Intestine. *Cells*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/cells9040822>
- Lee, B., Moon, K. M., & Kim, C. Y. (2018). Tight junction in the intestinal epithelium: Its association with diseases and regulation by phytochemicals. *Journal of Immunology Research*, 2018(Figure 2). <https://doi.org/10.1155/2018/2645465>
- Lee, E. Y. H. P., Lee, W. H., Kaetzel, C. S., Parry, G., & Bissell, M. J. (1985). Interaction of mouse mammary epithelial cells with collagen substrata: Regulation of casein gene expression and secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(5), 1419–1423. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.5.1419>
- Luu, L., Johnston, L. J., Derricott, H., Armstrong, S. D., Randle, N., Hartley, C. S., ... Coombes, J. L. (2019). An open-format enteroid culture system for interrogation of interactions between *Toxoplasma gondii* and the intestinal epithelium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(AUG), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00300>
- Magno, R. C., Lemgruber, L., Vommaro, R. C., De Souza, W., & Attias, M. (2005). Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microscopy Research and Technique*, 67(1), 45–52. <https://doi.org/10.1002/jemt.20182>
- Meneses, A. M. C., Schneeberger, K., Kruitwagen, H. S., Penning, L. C., van Steenbeek, F. G., Burgener, I. A., & Spee, B. (2016). Intestinal organoids-Current and future applications. *Veterinary Sciences*, 3(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/vetsci3040031>
- Moscona, A. A. (1959). Tissues from dissociated cells. *Scientific American*, 200(5). <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0559-132>

- Moscona, A. A., & Moscona, H. (1952). The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *Journal of Anatomy*, 86(3), 287–301. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12980879><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1273752>
- Moura, M. de A., Amendoeira, M. R. R., & Barbosa, H. S. (2009). Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(6), 862–864. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000600007>
- Nalapareddy, K., Hassan, A., Sampson, L. L., Zheng, Y., & Geiger, H. (2021). Suppression of elevated Cdc42 activity promotes the regenerative potential of aged intestinal stem cells. *iScience*, 24(4), 102362. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102362>
- Nalapareddy, K., Nattamai, K. J., Kumar, R. S., Karns, R., Wikenheiser-Brokamp, K. A., Sampson, L. L., ... Geiger, H. (2017). Canonical Wnt Signaling Ameliorates Aging of Intestinal Stem Cells. *Cell Reports*, 18(11), 2608–2621. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.056>
- Navis, M., Martins Garcia, T., Renes, I. B., Vermeulen, J. L., Meisner, S., Wildenberg, M. E., ... Muncan, V. (2019). Mouse fetal intestinal organoids: new model to study epithelial maturation from suckling to weaning. *EMBO Reports*, 20(2), 1–12. <https://doi.org/10.15252/embr.201846221>
- Nickerson, K. P., Llanos-Chea, A., Ingano, L., Serena, G., Miranda-Ribera, A., Perlman, M., ... Faherty, C. S. (2021). A Versatile Human Intestinal Organoid-Derived Epithelial Monolayer Model for the Study of Enteric Pathogens. *Microbiology Spectrum*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00003-21>
- Nicolle, C., & Manceaux, L. H. (1908). Sur Une Infection à Corps de Leishman (Ou Organismes Voisins) Du Gondi. *Comptes Rendus Séances L'académie Sci*, 147, 763–766. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.001>
- Noben, M., Vanhove, W., Arnauts, K., Santo Ramalho, A., Van Assche, G., Vermeire, S., ... Ferrante, M. (2017). Human intestinal epithelium in a dish: Current models for research into gastrointestinal pathophysiology. *United European Gastroenterology Journal*, 5(8), 1073–1081.

<https://doi.org/10.1177/2050640617722903>

- O'Rourke, K., Ackerman, S., Dow, L., & Lowe, S. (2016). Isolation, Culture, and Maintenance of Mouse Intestinal Stem Cells. *Bio-Protocol*, 6(4). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1733>
- Orkin, B. Y. R. W., Gehron, P., Mcgoodwin, E. B., George, R., Valentine, T., & Swarm, R. (1977). A Murine Tumor Producing a Matrix of Basement Membrane. *Journal of Experimental Medicine*, 145(1), 204–220.
- Pance, A. (2021). The stem cell revolution revealing protozoan parasites' secrets and paving the way towards vaccine development. *Vaccines*, 9(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020105>
- Peng, H., Tan, F., & Lindsay, D. S. (2015). Pathogenesis of *Toxoplasma gondii* in Humans. *Human Emerging and Re-emerging Infections*, 1, 303–317. <https://doi.org/10.1002/9781118644843.ch16>
- Pentimikko, N., Iqbal, S., Mana, M., Andersson, S., Iij, A. B. C., Suci, R. M., ... Jacks, T. (2019). Notum produced by Paneth cells attenuates regeneration of aged intestinal epithelium. *Nature*, 571.
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 141–153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>
- Puschhof, J., Pleguezuelos-Manzano, C., Martinez-Silgado, A., Akkerman, N., Saftien, A., Boot, C., ... Clevers, H. (2021). Intestinal organoid cocultures with microbes. *Nature Protocols*, 16(10), 4633–4649. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00589-z>
- Ramakrishnan, C., Maier, S., Walker, R. A., Rehrauer, H., Joekel, D. E., Winiger, R. R., ... Smith, N. C. (2019). An experimental genetically attenuated live vaccine to prevent transmission of *Toxoplasma gondii* by cats. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37671-8>
- Romano, J. D., & Coppens, I. (2013). Host Organelle Hijackers: A similar modus operandi for *Toxoplasma gondii* and *Chlamydia trachomatis*: Co-infection model as a tool to investigate pathogenesis. *Pathogens and Disease*, 69(2), 72–86. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12057>
- Roodsant, T., Navis, M., Aknouch, I., Renes, I. B., van Elburg, R. M., Pajkrt, D., ...

- Muncan, V. (2020). A Human 2D Primary Organoid-Derived Epithelial Monolayer Model to Study Host-Pathogen Interaction in the Small Intestine. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(June), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00272>
- Sabin, A. B. (1941). TOXOPLASMIC ENCEPHALITIS IN CHILDREN. *The Journal of the American Medical Association*, 116(9), 801–807.
- Sanchez, S. G., & Besteiro, S. (2021). The pathogenicity and virulence of *Toxoplasma gondii*. *Virulence*, 12(1), 3095–3114. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2012346>
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., Van De Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., ... Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244), 262–265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
- Saxena, K., Blutt, S. E., Ettayebi, K., Zeng, X.-L., Broughman, J. R., Crawford, S. E., ... Estes, M. K. (2016). Human Intestinal Enteroids: a New Model To Study Human Rotavirus Infection, Host Restriction, and Pathophysiology. *Journal of Virology*, 90(1), 43–56. <https://doi.org/10.1128/jvi.01930-15>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 671–675. https://doi.org/10.1007/978-1-84882-087-6_9
- Simian, M., & Bissell, M. J. (2017). Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *Journal of Cell Biology*, 216(1), 31–40. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610056>
- Simian, M., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., & Bissell, M. J. (2001). The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development*, 128(16), 3117–3131. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
- Sinclair, A. J., McLean, J. G., & Monger, E. A. (1979). Metabolism of linoleic acid in the cat. *Lipids*, 14(11), 932–936. <https://doi.org/10.1007/BF02533508>
- Sirakov, M., Borra, M., Cambuli, F. M., & Plateroti, M. (2013). Defining suitable reference

- genes for RT-qPCR analysis on intestinal epithelial cells. *Molecular Biotechnology*, 54(3), 930–938. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9643-3>
- Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., & Goodenough, D. A. (1986). Identification of ZO-1: A high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (Zonula Occludens) in a variety of epithelia. *Journal of Cell Biology*, 103(3), 755–766. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.3.755>
- Strangeways, T. S. P., & Fell, H. B. (1926). Experimental studies on the differentiation of embryonic tissues growing in vivo and in vitro .—II. The development of the isolated early embryonic eye of the fowl when cultivated in vitro . *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 100(703), 273–283. <https://doi.org/10.1098/rspb.1926.0049>
- Sutrave, S., & Richter, M. H. (2021). Truman show for protozoan parasites: A review of in vitro cultivation platforms. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(8), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009668>
- Swarm, R. L. (1963). Transplantation of a murine chondrosarcoma in mice of different inbred strains. *Journal of the National Cancer Institute*, 31(4), 953–975. <https://doi.org/10.1093/jnci/31.4.953>
- Tekes, G., Ehmann, R., Boulant, S., & Stanifer, M. L. (2020). Development of Feline Ileum- and Colon-Derived Organoids and Their Potential Use to Support Feline Coronavirus Infection. *Cells*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/cells9092085>
- Thorne, C. A., Chen, I. W., Sanman, L. E., Cobb, M. H., Wu, L. F., & Altschuler, S. J. (2018). Enteroid Monolayers Reveal an Autonomous WNT and BMP Circuit Controlling Intestinal Epithelial Growth and Organization. *Developmental Cell*, 44(5), 624–633.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.01.024>
- van der Hee, B., Loonen, L. M. P., Taverne, N., Taverne-Thiele, J. J., Smidt, H., & Wells, J. M. (2018). Optimized procedures for generating an enhanced, near physiological 2D culture system from porcine intestinal organoids. *Stem Cell Research*, 28, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.02.013>
- Wallach, T. E., & Bayrer, J. R. (2017). Intestinal Organoids: New Frontiers in the Study of Intestinal Disease and Physiology. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 64(2), 180–185. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001411>

- Wang, Yubao, Weiss, L. M., & Orlofsky, A. (2010). Coordinate control of host centrosome position, organelle distribution, and migratory response by *Toxoplasma gondii* via host mTORC2. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(20), 15611–15618. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.095778>
- Wang, Yuli, DiSalvo, M., Gunasekara, D. B., Dutton, J., Proctor, A., Lebhar, M. S., ... Allbritton, N. L. (2017). Self-renewing Monolayer of Primary Colonic or Rectal Epithelial Cells. *Cmgh*, *4*(1), 165-182.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.02.011>
- Weiss, L. M., & Dubey, J. P. (2009). Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *International Journal for Parasitology*, *39*(8), 895–901. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>
- Williamson, I. A., Arnold, J. W., Samsa, L. A., Gaynor, L., DiSalvo, M., Cocchiario, J. L., ... Magness, S. T. (2018). A High-Throughput Organoid Microinjection Platform to Study Gastrointestinal Microbiota and Luminal Physiology. *Cmgh*, *6*(3), 301–319. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.05.004>
- Yoshida, S., Miwa, H., Kawachi, T., Kume, S., & Takahashi, K. (2020). Generation of intestinal organoids derived from human pluripotent stem cells for drug testing. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63151-z>
- Zhao, X., Li, C., Liu, X., Chiu, M. C., Wang, D., Wei, Y., ... Zhou, J. (2021). Human Intestinal Organoids Recapitulate Enteric Infections of Enterovirus and Coronavirus. *Stem Cell Reports*, *16*(3), 493–504. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.02.009>