


TOPOGRAFIA E INTERAÇÃO CELULAR: APLICAÇÃO DA MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA EM ESTUDOS COM TOXOPLASMA GONDII <https://doi.org/10.63330/aurumpub.021-006>**Everson Reili de Souza Teles**

Mestre em Ciências Biomédicas

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão,

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem

E-mail: everson.rsteles@gmail.com**RESUMO**

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório capaz de infectar uma ampla gama de animais de sangue quente, permanecendo como um problema global de saúde pública. Compreender os mecanismos subjacentes à interação parasita–célula hospedeira é essencial para elucidar as etapas iniciais da infecção. Neste estudo, aplicamos microscopia de força atômica (AFM) combinada à microscopia de fluorescência para caracterizar, em resolução nanométrica, os estágios iniciais da interação entre taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH) e células hospedeiras de mamíferos (LLC-MK2 e HFF). Um protocolo de fixação otimizado com 4% de formaldeído e 1% de glutaraldeído assegurou a preservação morfológica, mantendo propriedades mecânicas adequadas para análise topográfica. A avaliação quantitativa de 100 células por experimento revelou que, após 15 minutos de incubação, a maioria dos taquizoítos permaneceu aderida à superfície das células hospedeiras, com menor número em contato ou totalmente internalizados. As imagens obtidas por AFM revelaram a participação da célula hospedeira durante a invasão, mostrando invaginações localizadas da membrana, projeções do conóide e numerosas extensões ricas em actina semelhantes a filopódios e nanotubos de tunelamento, direcionadas ao parasita. O mapeamento nanomecânico demonstrou padrões distintos de altura e elasticidade na interface hospedeiro–parasita, indicando remodelamento ativo do citoesqueleto e engajamento da membrana durante a internalização. Esses resultados destacam a AFM como uma abordagem complementar poderosa à microscopia de fluorescência, fornecendo insights inéditos sobre a topografia, elasticidade e remodelamento dinâmico das membranas celulares durante a invasão por *T. gondii*. A compreensão dessas interações estruturais e mecânicas contribui para elucidar os determinantes iniciais da infecção e pode auxiliar na identificação de novos alvos terapêuticos.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; Microscopia de força atômica; Interação hospedeiro–parasita; Invasão celular; Nanomecânica; Remodelamento do citoesqueleto.



1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório de distribuição mundial, altamente eficiente em seu processo de invasão, com capacidade de infectar uma ampla variedade de vertebrados homeotérmicos, aves e animais de importância econômica (Dubey, 2010; Montoya & Liesenfeld, 2004). No Brasil, a infecção por *T. gondii* apresenta alta prevalência em todas as regiões, afetando tanto humanos quanto animais domésticos (Dubey et al., 2012; Pena et al., 2008).

O processo de invasão do *T. gondii* nas células hospedeiras ocorre em menos de 20 segundos e é caracterizado por um mecanismo de penetração ativa mediado por proteínas secretórias provenientes de complexos apicais, como micronemas, roptrias e grânulos densos (Carruthers & Boothroyd, 2007; Lorenzi et al., 2016). Forma-se uma junção móvel como resultado da forte associação entre a extremidade apical do parasita e a superfície da célula hospedeira, durante a qual o parasita secreta proteínas de adesão e ancoragem na membrana da célula hospedeira, levando à sua internalização dentro de um vacúolo parasitóforo (Dubey, 2021; de Souza & Portes in Martins-Duarte & Adesse, 2021).

Entre as metodologias disponíveis para estudos morfológicos e topográficos dessas interações, a microscopia de força atômica (AFM) destaca-se como uma ferramenta promissora. Essa técnica possibilita a visualização da superfície celular em alta resolução, permitindo análises tridimensionais e nanomecânicas de eventos como adesão, invaginação da membrana e formação de estruturas associadas ao citoesqueleto durante o processo de invasão (Binnig et al., 1986; Hoh & Engel, 1993; Cappella & Dietler, 1999). A AFM tem sido aplicada com sucesso ao estudo de protozoários como *Plasmodium* e *Giardia* e, mais recentemente, às investigações das interações de *T. gondii* com células hospedeiras (de Souza & Rocha, 2011).

Neste estudo, empregamos a microscopia de força atômica para caracterizar, com alta resolução, os eventos iniciais de interação entre taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* e células epiteliais LLC-MK2 e fibroblastos HFF. O objetivo foi mapear, em níveis topográficos e nanomecânicos, as alterações na superfície da célula hospedeira e as estruturas envolvidas na formação da junção móvel, visando aprofundar a compreensão morfológica desse processo crucial de infecção.

Compreender a interação inicial entre uma célula hospedeira e um parasita intracelular é essencial, pois os determinantes envolvidos podem ser explorados como potenciais alvos terapêuticos para bloquear a infecção em seus estágios mais precoces, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias inovadoras de tratamento. Considerando a existência de diferentes processos possíveis de invasão pelo parasita, buscamos descrever com maior detalhe os eventos associados à invasão. Para isso, foram utilizados taquizoítos da cepa RH e as linhagens celulares LLC-MK2 e HFF. Por meio da sincronização dos eventos de entrada, optamos por realizar nossas análises após 15 minutos de interação. As análises incluíram microscopia de fluorescência para quantificar a entrada dos taquizoítos nas células hospedeiras e



microscopia de força atômica. Após a sincronização, observamos a participação da célula hospedeira na internalização do parasita, numerosas projeções celulares envolvidas durante a entrada e nanotubos projetados da célula hospedeira em direção ao parasita.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Foram utilizadas duas linhagens distintas de células hospedeiras: células epiteliais de rim de macaco rhesus (*Macaca mulatta*), LLC-MK2 (ATCC – CCL7, Rockville, MD/USA), cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino; e células fibroblásticas de prepúcio humano, HFF1, cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Hyclone, Logan, UT), 1% de estreptomicina e penicilina, e 2 mM de L-glutamina (Sigma). As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

2.2 PARASITAS

Taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos por passagens seriadas em células LLC-MK2 confluentes. Dois a três dias após a infecção, os parasitas obtidos do sobrenadante foram centrifugados a 1000 × g por 10 minutos, ressuspensos em meio RPMI e contados utilizando câmara de Neubauer.

2.3 INTERAÇÃO PARASITA–CÉLULA HOSPEDEIRA

Um dia antes dos experimentos de interação, 5 × 10⁵ células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro redondas estéreis em placas de 24 poços ou distribuídas em frascos de cultura de 25 cm². Em seguida, as células foram lavadas três vezes com solução tampão fosfato (PBS), e os parasitas foram adicionados na proporção de 50:1 (parasitas:célula). Posteriormente, as culturas foram incubadas a 4 °C por 30 minutos para sincronizar a invasão do parasita. Após esse período, as células foram transferidas para incubadora a 37 °C e incubadas por aproximadamente 19 minutos. Nessa etapa, com o meio atingindo cerca de 20 °C, o parasita recupera a motilidade e interage com a célula, sincronizando os eventos de entrada. Após 15 minutos de interação, as células foram processadas para análises microscópicas.

2.4 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Após a sincronização dos eventos de entrada entre *T. gondii* e células hospedeiras, as amostras foram fixadas em formaldeído a 4% em tampão PBS (pH 7,5) por 15 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes com PBS (pH 7,5) e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% em PBS contendo 3% de albumina bovina (BSA) por 10 minutos, repetido três vezes. Após a permeabilização, as amostras



foram novamente lavadas três vezes com PBS (pH 7,5) e incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpo primário anti-SAG (antígeno de superfície do taquizoíto) diluído 1:500. No dia seguinte, as amostras foram lavadas três vezes com PBS (pH 7,5) e incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 546 (1:1000) por 2 horas à temperatura ambiente, protegido da luz. As observações foram realizadas em modo confocal utilizando microscópio Zeiss Elyra PS.1 LSM 710 (Alemanha).

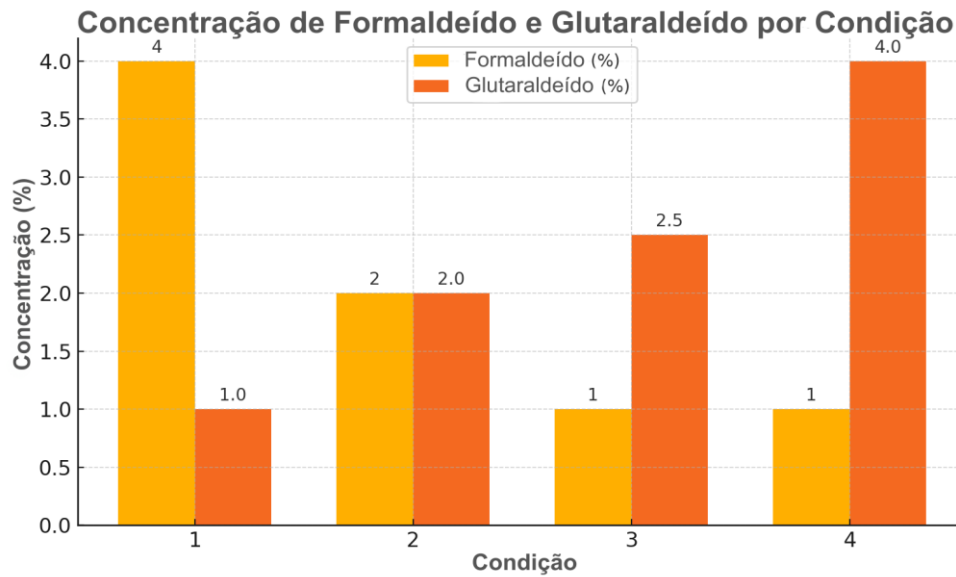
2.5 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

As amostras foram fixadas em solução contendo 1% de glutaraldeído e 4% de formaldeído em tampão fosfato de sódio (pH 7,2) por 1 hora, lavadas com PBS (pH 7,2) e pós-fixadas por 1 hora em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato, protegidas da luz. As células foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30% a 100%) por 10 minutos em cada etapa e secas por ponto crítico com CO₂. As imagens foram obtidas à temperatura ambiente utilizando microscópio de varredura Bruker Dimension Icon Scanning Probe. Foram utilizados cantilêveres com constantes de mola entre 0,4 N/m e 2 N/m. Para análise das propriedades nanomecânicas, foi realizada calibração completa do cantilêver. Para minimizar danos e ruídos, as imagens foram adquiridas com frequência de varredura de aproximadamente 1 Hz e resolução de 512 × 512 pixels. Para auxiliar nas análises, a matriz de dados que gera imagens planificadas foi transformada em visualização tridimensional, proporcionando melhor interpretação dos dados obtidos por AFM (de Souza & Rocha, 2011).

3 RESULTADOS

A ultraestrutura da invasão de *Toxoplasma gondii* em células hospedeiras foi observada por meio de microscopia de fluorescência e imagens topográficas geradas por AFM, nas quais foram analisados os eventos iniciais de interação e até mesmo o processo de invasão do parasita, evidenciando claramente a participação da célula hospedeira. A fixação adequada é crítica para preservar a morfologia celular e obter imagens de alta qualidade. Neste estudo, diferentes combinações de formaldeído e glutaraldeído foram testadas para identificar o protocolo mais eficaz na manutenção da integridade estrutural das amostras, conforme mostrado na Figura 1.

Figura 1. Concentrações de formaldeído e glutaraldeído utilizadas sob diferentes condições experimentais. Cada condição corresponde a uma combinação específica de concentrações de fixadores aplicadas às amostras celulares. As barras representam a porcentagem de cada fixador. Os dados são representativos de protocolos padronizados para preservação morfológica

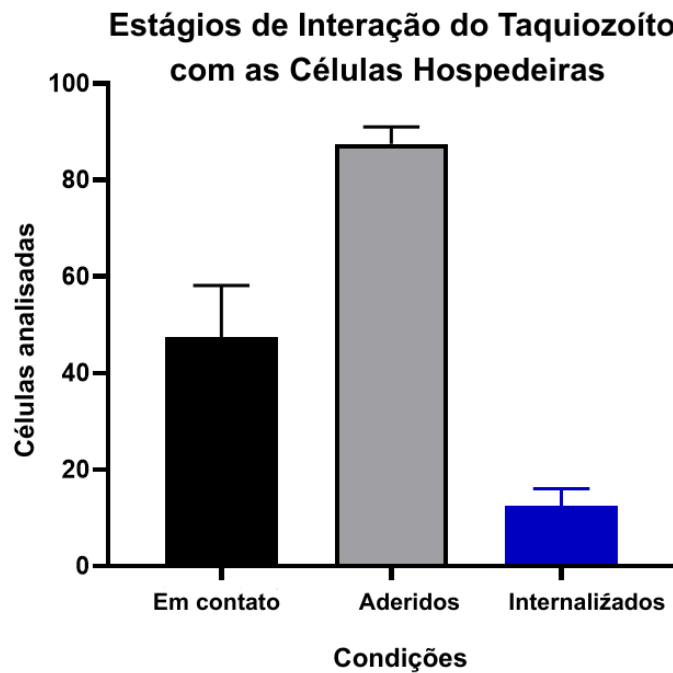


Fonte: Autor (2025).

Entre as formulações testadas, altas concentrações de glutaraldeído ($\geq 2,5\%$) asseguraram excelente preservação ultraestrutural, mas comprometeram a topografia. Combinações balanceadas (2% FA/ 2% GA) proporcionaram boa preservação estrutural; entretanto, quando o cantiléver entrou em contato direto com a amostra, houve perda significativa de informações topográficas, reduzindo a fidelidade dos dados. Em contraste, a formulação 4% FA / 1% GA mostrou-se mais adequada para este ensaio, pois preservou a morfologia geral tanto das células hospedeiras quanto dos parasitas, minimizando o enrijecimento excessivo. Isso permitiu a visualização precisa da interface hospedeiro–parasita e manteve a adequação para estudos morfológicos. Assim, embora fixadores ricos em GA sejam preferíveis para microscopia eletrônica de alta resolução, a escolha final de 1% GA + 4% FA representou a melhor estratégia para equilibrar preservação estrutural com os requisitos dos estudos de interação *T. gondii*–hospedeiro por AFM.

Com o protocolo de fixação para AFM estabelecido, 100 células por experimento foram analisadas em triplicata, e os taquizoítos de *T. gondii* foram classificados conforme o estágio de interação: adesão, contato e internalização. Após 15 minutos de incubação, os parasitas estavam predominantemente aderidos à superfície da célula hospedeira, seguidos por aqueles em contato e um número menor de parasitas internalizados. A análise estatística (ANOVA com teste de Tukey) revelou diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$), indicando que o tempo experimental foi suficiente para capturar fases distintas da entrada do parasita, com ênfase nos eventos iniciais de adesão (Figura 2).

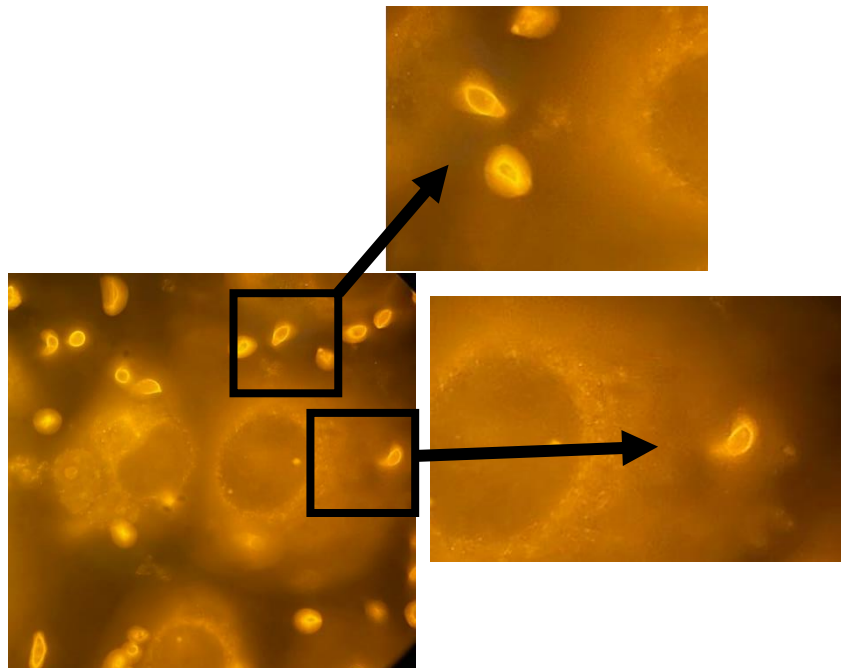
Figura 2: Quantificação de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* classificados conforme sua interação com células hospedeiras após 15 minutos de incubação. Os parasitas foram agrupados em três categorias: aderidos (fixos à superfície celular), em contato (em processo de entrada) e internalizados (completamente dentro da célula). Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes, com $n = 100$ células analisadas por condição. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do teste de Tukey, considerando $p < 0,05$ como significativo.



Fonte: Autor (2025).

A microscopia de fluorescência foi utilizada para visualizar o processo de invasão. A marcação do antígeno de superfície (SAG) permitiu observar a interação inicial entre o taquizoóito e a célula hospedeira. Nas imagens obtidas, a membrana da célula hospedeira apresentou invaginação localizada no ponto de contato com o parasita, indicativa da formação da junção móvel — estrutura essencial para o processo ativo de internalização promovido por *T. gondii* (Figura 3).

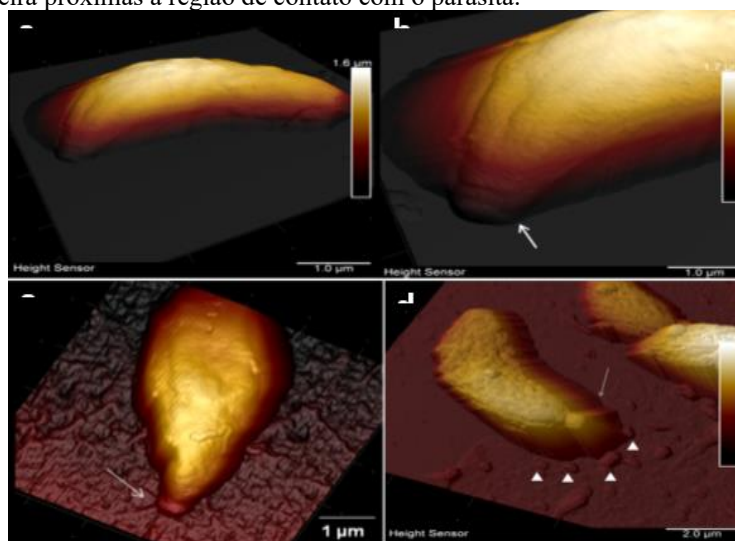
Figura 3. Microscopia de fluorescência mostrando marcação do antígeno de superfície de *Toxoplasma gondii* (SAG) durante os eventos iniciais de invasão. Observa-se invaginação da membrana da célula hospedeira no ponto de contato com o taquizoíto, sugerindo o local de formação da estrutura conhecida como junção móvel.



Fonte: Autor (2025).

Nos estágios iniciais do processo de invasão, que consiste no reconhecimento celular (**Figura 4a**) seguido pela adesão do parasita (**Figura 4b**), ocorre a projeção do conóide (**Figura 4c**) juntamente com a secreção de proteínas necessárias para a formação da junção móvel. Durante esses eventos iniciais, também foram observadas projeções da membrana da célula hospedeira envolvendo o parasita (**Figuras 4c e 4d**).

Figura 4. Ultraestrutura de *T. gondii* por AFM interagindo com células LLC-MK2. a. Fixado com formaldeído após 15 minutos de interação, mostrando todo o corpo do taquizoíto com conóide (seta) interagindo com a célula hospedeira. b. Maior aumento da projeção do conóide (seta). c. Setas indica o conóide na superfície da célula hospedeira. d. Cabeça de seta mostra projeções da membrana da célula hospedeira próximas à região de contato com o parasita.

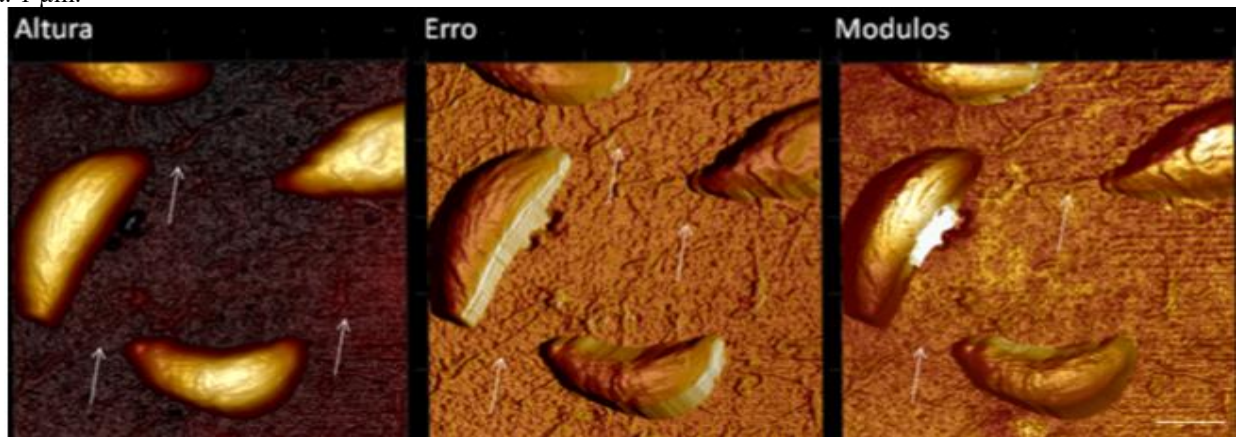


Fonte: Autor (2025).

Horizons of Multidisciplinary Studies

Na **Figura 5**, observam-se projeções semelhantes a filopódios emitidas pela célula hospedeira em regiões de contato com *T. gondii*. A análise das imagens de AFM revelou sinais distintos de altura e elasticidade nessas áreas, indicando a presença de possíveis filamentos direcionados ao parasita. Essas estruturas são consistentes com nanotubos de tunelamento — extensões ricas em actina comumente associadas a eventos de adesão e reconhecimento celular.

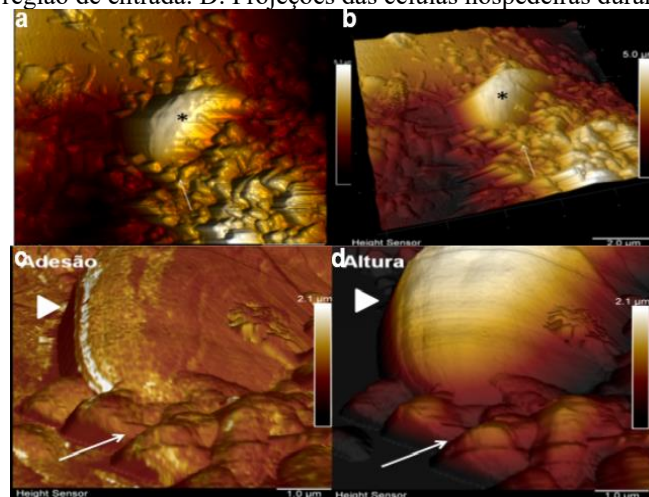
Figura 5. Projeções semelhantes a filopódios emitidas pela célula hospedeira em regiões de contato com o parasita. Sinais de altura e elasticidade próximos a essas regiões sugerem possíveis filamentos emitidos pela célula hospedeira (seta). Barra de escala: 1 μm .



Source: Author's own work (2025).

A análise topográfica revelou internalização lateral do parasita, com o taquizoíta assumindo uma forma de “meia-lua” (**Figura 6a**). Múltiplas projeções da membrana da célula hospedeira também foram observadas nessa região (**Figura 6b**), aparecendo em todas as áreas de contato com o parasita, formando um padrão sustentado pelos dados de adesão e altura (**Figuras 6c e 6d**).

Figura 6. Representação tridimensional de imagens de altura durante a invasão do taquizoíta, observada utilizando uma sonda de ponta única. A. As setas indicam projeções da célula hospedeira, e a orientação lateral do parasita é marcada com um asterisco durante a entrada. C. Na cabeça da seta, o taquizoíta está cercado pela membrana da célula hospedeira, indicada por uma seta, com numerosas projeções nessa região de entrada. D. Projeções das células hospedeiras durante a entrada via AFM.

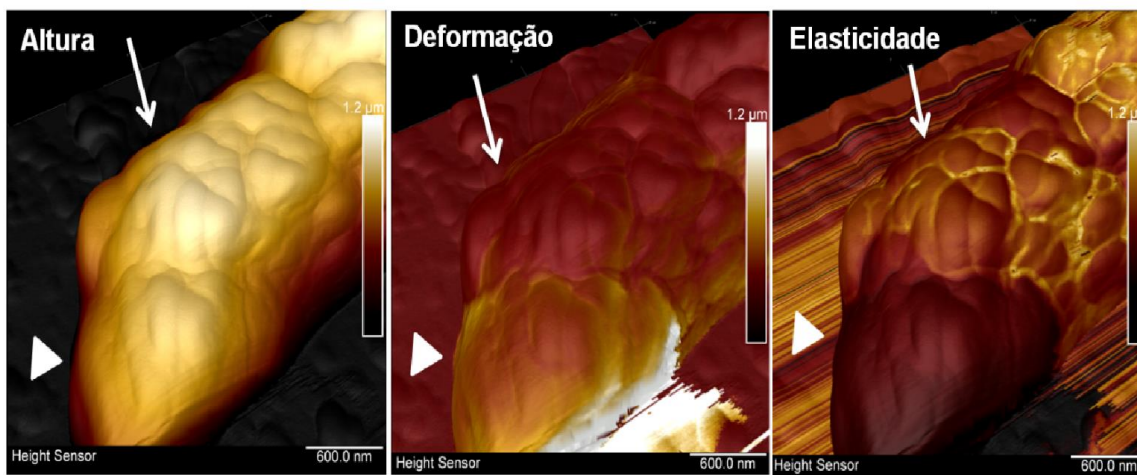


Source: Autor (2025).

Horizons of Multidisciplinary Studies

A densidade superficial na região de entrada do taquizoíto foi maior em comparação às regiões apenas de adesão. Na **Figura 7**, as leituras do sinal de elasticidade permitiram diferenciar entre regiões da membrana da célula hospedeira — aquelas com sinais de elasticidade mais elevados correspondendo à membrana que envolve o parasita, enquanto a porção não internalizada emitiu sinais de elasticidade mais baixos.

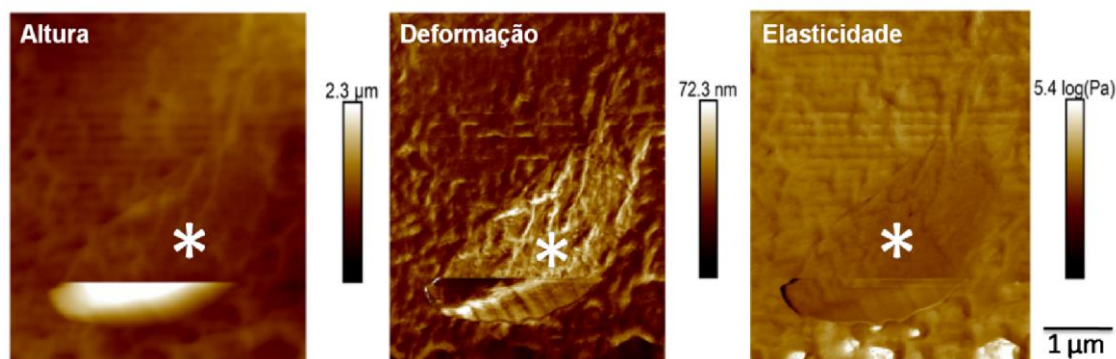
Figura 7. Membrana da célula hospedeira envolvendo taquizoítos de *T. gondii* observada por AFM com dados de altura, deformação e elasticidade. A seta indica a membrana da célula hospedeira envolvendo o parasita, com a cabeça da seta mostrando a parte do corpo do parasita ainda não englobada.



Fonte: Autor (2025).

Durante a varredura, a sonda do cantiléver percorreu o parasita; após sua remoção, sinais de deformação foram detectados na área anteriormente ocupada pelo parasita, indicando possível rearranjo da superfície da membrana da célula hospedeira no local de adesão e contato (Figura 8).

Figura 8. Superfície da célula hospedeira após varredura do parasita pela sonda. O asterisco marca a área que, antes da varredura, correspondia ao local de ancoragem do taquizoíto na célula hospedeira, que foi inesperadamente removida durante o processo com o cantiléver.



Fonte: Autor (2025).



4 DISCUSSÃO

O estudo das interações entre protozoários patogênicos e células hospedeiras — especialmente aqueles capazes de penetrar e se replicar intracelularmente — tem sido foco de pesquisas extensivas. No caso de *Toxoplasma gondii*, evidências indicam que ele pode ser internalizado por diversos tipos celulares; entretanto, a simples entrada não garante sucesso na infecção e multiplicação intracelular. Para que a infecção seja bem-sucedida, é necessário um mecanismo ativo de invasão envolvendo os organelos apicais do parasita. Neste trabalho, analisamos dados observáveis do processo inicial de interação utilizando microscopia de força atômica, com foco nos primeiros quinze minutos de interação, período previamente demonstrado como associado a diversas morfologias celulares (Teles et al., 2023).

A escolha da concentração de fixadores é crítica para a preservação morfológica, antigenicidade e rigidez celular, particularmente em estudos de interações entre células de mamíferos e *T. gondii*. Na busca por um protocolo de fixação eficiente e padronizado, diferentes combinações de formaldeído (FA) e glutaraldeído (GA) foram avaliadas para otimizar a preservação morfológica sem comprometer a integridade estrutural. A análise comparativa de quatro formulações — (1) 4% FA + 1% GA, (2) 2% FA + 2% GA, (3) 1% FA + 2,5% GA e (4) 1% FA + 4% GA — revelou que altas concentrações de GA, embora promovam excelente preservação ultraestrutural, causaram enrijecimento excessivo que limitou as análises de elasticidade.

Por outro lado, a formulação 4% FA + 1% GA apresentou o melhor desempenho geral: preservou a morfologia celular, evitou perda de material durante o contato com o cantiléver e minimizou artefatos estruturais. Esse equilíbrio entre fixadores e resposta da amostra tornou a combinação ideal para análises topográficas baseadas em AFM, sendo, portanto, adotada como protocolo padrão para as análises subsequentes. Técnicas microscópicas tradicionais têm sido amplamente empregadas para estudar as interações *T. gondii*–célula hospedeira (Dubey, 2021; de Souza & Portes in Martins-Duarte & Adesse, 2021; Teles, 2023). Contudo, a maioria concentra-se no desenvolvimento do parasita dentro do vacúolo parasitóforo.

Nossas observações por AFM corroboram a participação ativa da célula hospedeira durante a interação com o taquizoíto. Essa metodologia foi inicialmente aplicada por Aikawa (1997) para examinar interações *Plasmodium*–eritrócito e, posteriormente, estendida a outros protozoários (de Souza & Rocha, 2011). Os sinais capturados pela sonda indicaram aumento da elasticidade em regiões onde o taquizoíto estava parcialmente recoberto pela membrana da célula hospedeira. Considerando que *T. gondii* possui uma película trilaminar (Cintra & de Souza, 1985), essa sobreposição explica o aumento observado na elasticidade no contato sonda–amostra, enquanto sinais reduzidos de altura e elasticidade na região inferior sugerem áreas do corpo do parasita ainda não totalmente internalizadas.



Diversas alterações na superfície da célula hospedeira foram detectadas durante a varredura. Dependendo da morfologia e do contexto celular, essas protrusões podem ser classificadas como microvilosidades, lamelipódios, filopódios ou cones de crescimento (Condeelis, 1993). A biogênese dessas estruturas depende da organização do citoesqueleto e desempenha papéis essenciais na motilidade celular e na endocitose (Pantaloni et al., 2001), processos também associados à entrada passiva de *T. gondii* (Portes et al., 2019).

Os processos protrusivos requerem um sistema especializado de filamentos de actina que impulsiona o movimento da membrana. Os filamentos de actina são polarizados e, ao se ligarem à miosina, alongam-se rapidamente, empurrando a membrana para frente (Pantaloni et al., 2001). Embora ambos sejam projeções de membrana relacionadas ao citoesqueleto, os filopódios têm sido descritos em diversos contextos biológicos.

Por meio da microscopia de força atômica, observamos que, após a varredura de um taquizoíto aderido, a superfície da membrana da célula hospedeira sofreu reorganização, indicando ancoragem do parasita. Durante a interação *T. gondii*–célula hospedeira, ocorre intenso remodelamento na área de contato, envolvendo as estruturas mencionadas e outras, ressaltando a necessidade de novas abordagens e técnicas para compreender plenamente as interações hospedeiro–parasita.



REFERÊNCIAS

- AIKAWA, M. Studies on falciparum malaria with atomic-force and surface-potential microscopes [Estudos sobre malária falciparum com microscópios de força atômica e potencial de superfície]. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 91, n. 7, p. 689–692, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1080/00034989760419>.
- BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscope [Microscópio de força atômica]. *Physical Review Letters*, v. 56, n. 9, p. 930–933, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>.
- BHUSHAN, B. *Springer Handbook of Nanotechnology* [Manual Springer de Nanotecnologia]. 3. ed. Berlin: Springer, 2010. ISBN: 978-3-642-02525-9.
- CAPPELLA, B.; DIETLER, G. Force-distance curves by atomic force microscopy [Curvas força-distância por microscopia de força atômica]. *Surface Science Reports*, v. 34, n. 1–3, p. 1–104, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-5729\(99\)00003-5](https://doi.org/10.1016/S0167-5729(99)00003-5).
- CARRUTHERS, V. B.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion [Unindo forças: um modelo integrado da invasão celular por Toxoplasma]. *Current Opinion in Microbiology*, v. 10, n. 1, p. 83–89, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.017>.
- CINTRA, W. L.; DE SOUZA, W. Distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes in the cell membranes of Toxoplasma gondii [Distribuição de partículas intramembranas e complexos filipina-esterol nas membranas celulares de Toxoplasma gondii]. *European Journal of Cell Biology*, v. 37, p. 63–69, 1985.
- CONDEELIS, J. Life at the Leading Edge: The Formation of Cell Protrusions [Vida na borda: a formação de protrusões celulares]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 411–444, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.09.110193.002211>.
- DE SOUZA, W.; ROCHA, G. M. Atomic force microscopy: a tool to analyze the structural organization of pathogenic protozoa [Microscopia de força atômica: uma ferramenta para analisar a organização estrutural de protozoários patogênicos]. *Trends in Parasitology*, v. 27, n. 4, p. 160–167, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.12.010>.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis of Animals and Humans* [Toxoplasmose de Animais e Humanos]. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. ISBN: 978-1420087368.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis of Animals and Humans* [Toxoplasmose de Animais e Humanos]. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781003199373>.
- DUBEY, J. P.; RAJENDRAN, C.; FERREIRA, L. R.; MARTINS, J.; KWOK, O. C. H.; HILL, D. E.; SU, C. Global status of Toxoplasma gondii infection in humans and animals [Status global da infecção por Toxoplasma gondii em humanos e animais]. *Parasitology*, v. 139, n. 11, p. 1375–1424, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1017/S003118201200115X>.
- HOH, J. H.; ENGEL, A. Atomic force microscopy for high-resolution imaging in cell biology [Microscopia de força atômica para imagens de alta resolução em biologia celular]. *Trends in Cell Biology*, v. 3, n. 11, p. 208–213, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(93\)90105-A](https://doi.org/10.1016/0962-8924(93)90105-A).
- LORENZI, H.; KHAN, A.; BEHNKE, M. S.; NISSEN, J.; LEYVA, A.; MACKENZIE, B. A.; GRIGG, M. E.; BOOTHROYD, J. C.; SIBLEY, L. D. Local admixture of amplified and diversified secreted



pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes [Mistura local de determinantes de patogenicidade secretados amplificados e diversificados molda genomas mosaico de *Toxoplasma gondii*]. *Nature Communications*, v. 7, p. 10147, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms10147>.

MARTINS-DUARTE, É. dos S.; ADESSE, D. (org.). *Toxoplasma gondii: Biology and Role in Health and Disease* [Toxoplasma gondii: Biologia e Papel na Saúde e na Doença]. New York: Nova Science Publishers, 2021. Capítulo: Portes, J. A.; De Souza, W. *Toxoplasma gondii* Entry Mechanisms and Establishment of the Parasitophorous Vacuole [Mecanismos de entrada de *Toxoplasma gondii* e estabelecimento do vacúolo parasitóforo], p. 43–76.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis [Toxoplasmose]. *The Lancet*, v. 363, n. 9425, p. 1965–1976, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X).

MORRIS, V. J.; KIRBY, A. R.; GUNNING, A. P. *Atomic Force Microscopy for Biologists* [Microscopia de Força Atômica para Biólogos]. London: Imperial College Press, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1142/p644>.

PANTALONI, D.; LE CLAINCHE, C.; CARLIER, M. F. Mechanism of actin-based motility [Mecanismo da motilidade baseada em actina]. *Science*, v. 292, n. 5521, p. 1502–1506, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1059975>.

PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo State, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, and genotyping [Infecção por *Toxoplasma gondii* em gatos do Estado de São Paulo, Brasil: soroprevalência, eliminação de oocistos e genotipagem]. *Veterinary Parasitology*, v. 160, n. 1–2, p. 180–185, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.093>.

PORTES, J. A.; CARNEIRO, A. B.; DE SOUZA, W.; SEABRA, S. H. *Toxoplasma gondii* mechanisms of entry into host cells [Mecanismos de entrada de *Toxoplasma gondii* em células hospedeiras]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, 2020, article 605750. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.605750>.

TELES, E. R. de S.; PORTES, J. S.; DE SOUZA, W. New morphological observations on the initial events of interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian host cells using atomic force microscopy [Novas observações morfológicas sobre os eventos iniciais da interação entre *Toxoplasma gondii* e células hospedeiras de mamíferos usando microscopia de força atômica]. *Veterinary Parasitology*, v. 312, 2023, article 109869. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109869>.