

# CISTOGÉNESIS DE *TOXOPLASMA GONDII*\*

Norma Rivera Fernández y Ricardo Mondragón Flores

## RESUMEN

Con la alta incidencia de la enfermedad del VIH-SIDA, la toxoplasmosis ha vuelto a emerger y se ha posicionado como una de las enfermedades oportunistas más comunes en el mundo. Su diagnóstico se realiza principalmente mediante el uso de técnicas de tipo inmunológico, recientemente se ha estandarizado la técnica de la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) que detecta secuencias específicas del ADN de *Toxoplasma* tanto en sangre como en biopsias de tejidos de pacientes infectados. La aplicación de tratamientos farmacológicos y vacunas contra *Toxoplasma*, ha tenido un avance limitado debido en gran medida a la falta de modelos experimentales que permitan una exitosa diferenciación del taquizoíto a bradizoíto con la consecutiva inducción de la cistogénesis *in vitro*. La inducción eficiente y el aislamiento exitoso de preparaciones enriquecidas en quistes tisulares, permitirá la caracterización de su composición molecular y de sus propiedades inmunoprotectoras. Adicionalmente, permitirá la evaluación y el diseño de fármacos que sean capaces de atravesar la pared del quiste tisular a fin de eliminar a los parásitos ahí alojados.

**PALABRAS CLAVE:** *Toxoplasma gondii*, bradizoítos, cistogénesis.

## INTRODUCCIÓN

El parásito apicomplexa *Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular obligado que produce una enfermedad parasítica crónica normalmente asintomática en individuos inmunocompetentes, pero que en personas inmunocomprometidas como las infectadas con el virus del VIH-SIDA, o que están sometidas a tratamientos anticancerígenos o a inmunosupresores, produce encefalitis y muerte. Se ha reportado una mortalidad por en-

cefalitis toxoplásmica a nivel mundial hasta del 30% en enfermos inmunocomprometidos e infectados con *Toxoplasma*. El control farmacológico de esta parasitosis es hasta la fecha, la estrategia más utilizada debido a los esfuerzos poco exitosos en el desarrollo de vacunas contra este parásito (1). Sin embargo, la baja eficacia, los efectos secundarios y el desarrollo de resistencia a los fármacos disponibles en el mercado, junto con su incapacidad de atravesar

## ABSTRACT

With the rise of incidence of the AIDS-HIV disease, toxoplasmosis has re-emerged and positioned as one the most common opportunistic diseases in the world. Diagnosis of this parasitosis is achieved mainly by immunological methods; recently the technique of the polymease chain reaction (PCR) has been standardized to detect specific parasite's DNA sequences in blood and tissues of infected patients. Application of pharmacological treatments and vaccines against *Toxoplasma* has observed a limited advance due to the lack of experimental conditions that allow a successful differentiation from the tachyzoite to the bradyzoite form with the consecutive induction of cystogenesis *in vitro*. Efficient induction and successful isolation of enriched preparations with tissue cysts, will allow the characterization of their molecular composition and immunoprotector properties. In addition, it will allow the evaluation and design of drugs able to transverse the cyst wall in order to eliminate the intra-cyst parasites.

**KEY WORDS:** *Toxoplasma gondii*, bradyzoite, cystogenesis.

la pared quística, han representado un problema serio en el uso de fármacos contra este parásito. Por tanto, la búsqueda de posibles blancos terapéuticos en *Toxoplasma*, así como de moléculas con potenciales aplicaciones inmunoprotectoras, representan uno de los principales retos a futuro para la resolución de esta parasitosis. Debido a que en pacientes con SIDA, *T. gondii* ocasiona una encefalitis fatal necrosante que conduce a la muerte, la toxoplasmosis ha sido considerada

\*Recibido: 7 de abril de 2009 Aceptado: 1 de diciembre de 2009

Laboratorio de Patógenos Intracelulares. Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México DF. Correo E: rmflores@cinvestav.mx

dentro de las diez infecciones oportunistas más peligrosas en pacientes con esta enfermedad y causante de un 30% de mortalidad (2). En el humano, la infección con *Toxoplasma gondii* ocurre a nivel intestinal e inicia con la ingesta de ooquistes liberados en las heces de gatos enfermos y que contienen a los esporozoítos o bien por la ingesta de carne mal cocida, contaminada con quistes tisulares en los cuales se alojan los bradizoítos. Tanto los esporozoítos como los bradizoítos invaden el epitelio intestinal para posteriormente diferenciarse a la forma altamente invasiva y replicativa conocida como taquizoíto, la disemina el parásito por todos los tejidos del huésped. Todas las formas de diferenciación del *Toxoplasma* son virulentas e intracelulares obligadas. Es decir, que sólo pueden desarrollarse y proliferar dentro de la célula. Una vez dentro de la célula blanco, el taquizoíto lleva a cabo su proliferación intracelular por endodiogenia, un proceso asexual de división celular. Como resultado de la infección, se activa la respuesta inmune del huésped con la producción y liberación de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) por macrófagos activados, los cuales son capaces de fagocitar y destruir taquizoítos que pudieran encontrarse a nivel extracelular en los momentos previos a la invasión celular. La acción de los macrófagos o de otras células de defensa o de moléculas efectoras como los anticuerpos, complemento, etc., no son efectivos contra la forma intracelular del parásito. La presencia del IFN- $\gamma$  activa por otro lado, un proceso de diferenciación en *Toxoplasma* que conduce a la transformación de taquizoítos a bradizoítos, con la consecutiva modificación de la célula huésped infectada en un quiste tisular, un proceso que se conoce como cistogénesis. Los bradizoítos permanecen en estado de latencia dentro de los quistes tisulares a lo largo de la vida del huésped. El mecanismo de

diferenciación de la forma de taquizoíto a bradizoíto y los eventos moleculares de su regulación aún se desconocen. En términos de quimioterapia anti-toxoplásmica, hasta ahora no existen fármacos capaces de eliminar los quistes tisulares presentes en los huéspedes infectados ya que aún se desconocen las propiedades bioquímicas de los citados quistes tisulares así como de los bradizoítos alojados en su interior (2).

### **Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii***

El ciclo de vida de *T. gondii* involucra a dos tipos de huéspedes: los definitivos que incluyen a los felinos en quienes se desarrolla el ciclo sexual de reproducción y los huéspedes intermedios, como son animales de sangre caliente no felinos y el hombre, en los cuales se realiza la reproducción asexual del parásito. El ciclo inicia cuando el huésped definitivo (gato doméstico) ingiere presas en cuyos tejidos se encuentran quistes tisulares conteniendo bradizoítos, que son liberados a la luz intestinal por las enzimas digestivas del gato (3). Los bradizoítos invaden a los enterocitos intestinales y proliferan, diferenciándose en un macrogameto (célula femenina) y un microgameto (célula masculina). El microgameto posee un flagelo que le permite desplazarse sobre el epitelio intestinal para fecundar al macrogameto lo que da origen a un cigoto. Este cigoto se transforma en un ooquiste inmaduro no infectivo que es liberado al medio ambiente en las heces, contaminando agua y suelo. En condiciones de temperatura y humedad adecuadas, los ooquistes maduran a un estado infectivo conteniendo en su interior ocho esporozoítos que al ser ingeridos por un huésped intermedio, inician la infección. El huésped intermedio que incluye a animales de sangre caliente (vacas, borregos, cerdos, etc.) puede infectarse por la

ingesta de ooquistes maduros, los cuales como resultado del proceso digestivo, liberan a los esporozoítos que infectan a las células del epitelio intestinal. Dentro de estas células, los esporozoítos se transforman por diferenciación en taquizoítos, los cuales proliferan rápidamente dentro de una vacuola parasitófora (VP) por un proceso asexual de división celular conocido como endodiogenia, por el cual se forman dos parásitos de una célula madre. Al saturar el espacio intravacuolar, los taquizoítos salen de la célula destruyéndola e invadiendo células vecinas (3). Durante la diseminación tisular del *Toxoplasma*, se activa el sistema inmune con la participación de diversas células efectoras incluyendo los linfocitos B con la consecutiva producción de anticuerpos así como de linfocitos T y macrófagos que participan con acciones citotóxicas directas y mediante la secreción de citocinas tales como el interferón gama, el factor de necrosis tumoral y el óxido nítrico. Se ha determinado que la presencia de las citocinas mencionadas activan mecanismos moleculares no bien caracterizados, que resultan en la diferenciación de los taquizoítos en bradizoítos con la consecutiva transformación de la célula infectada en un quiste tisular. Estos quistes tisulares que contienen bradizoítos se localizan en todos los tejidos de los animales infectados y representan una forma de diseminación de la toxoplasmosis al ser ingerida la carne contaminada con quistes tisulares. En el hombre, tanto la ingesta de ooquistes maduros presentes en agua potable u hortalizas contaminadas o de carne mal cocida contaminada con quistes tisulares conteniendo bradizoítos representan formas comunes de transmisión de la parasitosis. Una vez que los esporozoítos o los bradizoítos invaden al epitelio intestinal humano, se diferencian en la forma de taquizoíto. Los taquizoítos prolifere-

ran y atraviesan la lámina basal intestinal para iniciar su diseminación tisular por vía sanguínea o linfática. Los quistes tisulares permanecen en forma latente hasta por varios años iniciando así una infección crónica (4). En individuos inmunológicamente no comprometidos y crónicamente infectados con *Toxoplasma*, los bradizoítos salen del quiste tisular y se diferencian a taquizoítos, diseminándose por todo el organismo. Esta reactivación de los parásitos de un estado crónico a uno agudo, se asocia con la migración de los taquizoítos a través de la barrera hemato-encefálica hacia órganos vitales como el cerebro en donde producen cuadros de encefalitis y posteriormente muerte. Cuando la infección con *Toxoplasma* ocurre durante el embarazo, el parásito alcanza la placenta e infecta al feto, produciendo daños oculares, cerebrales y aborto (5). En el modelo de toxoplasmosis murina, el tiempo en que los bradizoítos invaden los tejidos después de la infección vía oral es de 2 horas con la conversión a taquizoítos después de 18 horas. A las 24 horas post-infección se detecta una clara parasitemia, y a los 4 días, la distribución a los diferentes órganos. Estudios recientes sugieren que los bradizoítos durante el proceso de invasión, determinan mediante procesos aun no esclarecidos si formarán quistes tisulares o taquizoítos. La formación de quistes se observa 6 días después de la infección (5).

### Formas clonotípicas y cistogénesis *in vitro* de *Toxoplasma gondii*

Se ha descrito la existencia de tres formas clonotípicas de *Toxoplasma* de acuerdo a su genoma (Tipo I, II y III). Además de las diferencias genotípicas de las poblaciones clonotípicas de *Toxoplasma*, también se ha hecho una correlación con su grado de virulencia y distribución preferencial en ciertas especies animales. Ciertas cepas de baja virulencia de *Toxoplasma* del

tipo II y III presentan una predisposición al enquistamiento *in vitro* bajo condiciones de cultivo celular. Este tipo de cepas han sido utilizadas en el estudio del proceso de diferenciación de taquizoítos a bradizoítos y del proceso de enquistamiento celular o cistogénesis. Considerando la importancia de la cistogénesis en el ciclo biológico de *T. gondii* y en la patogénesis de la enfermedad, se han desarrollado diferentes métodos para inducir la diferenciación de taquizoítos a bradizoítos y quistes tisulares en cultivos de células infectadas (6). No obstante que la inducción del enquistamiento de *Toxoplasma in vitro* ha sido reportada desde la década de los sesenta, las bases moleculares por las cuales se da este fenómeno aún no están caracterizadas. Estudios previos realizados *in vitro* muestran que los factores inmunológicos no son siempre necesarios para la inducción de la formación del quiste tisular (4, 7). Hasta el momento se han estudiado factores de estrés que inducen el desarrollo de bradizoítos en células infectadas tales como: pH alcalino, IFN- $\gamma$  y otras citocinas pro-inflamatorias, alta temperatura, drogas y depleción de nutrientes (8).

**pH alcalino.** El mantenimiento de células infectadas con *Toxoplasma* en medio de cultivo con pH alcalino (8.0-8.2), es la estrategia más comúnmente utilizada para inducir la conversión de taquizoítos a bradizoítos *in vitro*, los bradizoítos obtenidos mediante este método presentan un fenotipo definido (9). La estrategia consiste en infectar el cultivo celular con taquizoítos de *T. gondii* por un par de horas en condiciones fisiológicas de pH (7.2-7.4), a fin de permitir la invasión de los parásitos para después cambiar el medio de cultivo a pH alcalino ajustado con KOH. Las células infectadas son cultivadas, por lo general en una atmósfera sin CO<sub>2</sub> exógeno, para evi-

tar la variación de pH. Sin embargo bajo estas condiciones, el cultivo celular sufre severos daños que limitan el estudio del desarrollo de los bradizoítos (9). La exposición de los taquizoítos extracelulares a pH alcalino durante una hora previa a la invasión de la célula huésped, activa la inducción de la conversión a bradizoítos, así se evita el daño sobre la célula huésped, pero, el rango de conversión es mucho menor al obtenido al cultivar las células invadidas con el parásito en pH alcalino. Tanto el daño directo al parásito como los cambios en la célula huésped pueden detonar la conversión (4).

**IFN- $\gamma$  y otras citocinas pro-inflamatorias.** El IFN- $\gamma$  es una citocina que participa en la inducción y regulación de la respuesta inmune celular que en el caso de la toxoplasmosis contribuye, entre otros aspectos, a la activación de macrófagos induciendo así un grado de resistencia contra el parásito. El IFN- $\gamma$  junto con otras citocinas induce varios mecanismos efectoros como son la producción de óxido nítrico y la limitación de triptofano, factores que limitan la replicación del parásito o causan su muerte (10). El cultivo de células infectadas con taquizoítos de *T. gondii* en presencia de IFN- $\gamma$  induce la formación de quistes. Este método de cistogénesis, mimetiza el efecto de citocinas de la respuesta inmune sobre el parásito (8). El enquistamiento inducido por IFN- $\gamma$  varía de acuerdo a la estirpe de las células huésped invadidas. En macrófagos invadidos, el enquistamiento ocurre de manera exitosa, lo cual no sucede en astrocitos de ratón y células neuronales de rata. Este método no ha funcionado con las cepas RH y VEG (11). Por otro parte, la interleucina 6 (IL-6) que se produce en procesos inflamatorios, es eficaz en la producción de quistes en fibroblastos humanos (4).

**Fármacos.** Dentro de los fármacos que se han utilizado con más frecuencia para inducir la cistogénesis están: pirimetamina, sulfadiazina, clindamicina, espiramicina, hidronaftoquinonas y macrólidos de nueva generación. La mayoría de estos fármacos disminuyen la replicación de *T. gondii*. La combinación de pirimetamina-sulfadiazina induce la interconversión con la expresión de antígenos bradizoíto-específicos. La atovacuona, es uno de los fármacos más efectivos en la interconversión y formación de quistes *in vitro* (8).

**Choque térmico.** Otra estrategia para inducir la conversión de *T. gondii* es la de aplicar cambios en las temperaturas de incubación de las células infectadas como factor de inducción de la diferenciación e interconversión a bradizoítos y formación de quistes *in vitro*. El procedimiento consiste en mantener las células no infectadas por dos horas a 34°C para que esta adquiere termo tolerancia. Las células son llevadas a 37°C por dos horas más, para su infección con taquizoítos de *T. gondii* y posteriormente es elevada la temperatura de incubación a 43°C durante 12-48 horas, después las células son mantenidas de nuevo a 37°C por el tiempo que dure el experimento. Bajo estas condiciones, se observa desde las 48 horas, la presencia de estructuras quísticas similares a las aisladas de cerebros de ratones infectados. Cabe mencionar que el tratamiento con calor induce la formación de quistes en cepas virulentas y avirulentas de *T. gondii* (12).

**Estrés nutricional.** Recientemente se ha observado que la privación de nutrientes como la arginina, bloquea de manera eficiente la replicación de *T. gondii* y dispara la diferenciación de taquizoíto a bradizoíto, así como el desarrollo *in vitro* de estructuras semejantes a quistes tisulares (12). *T.*

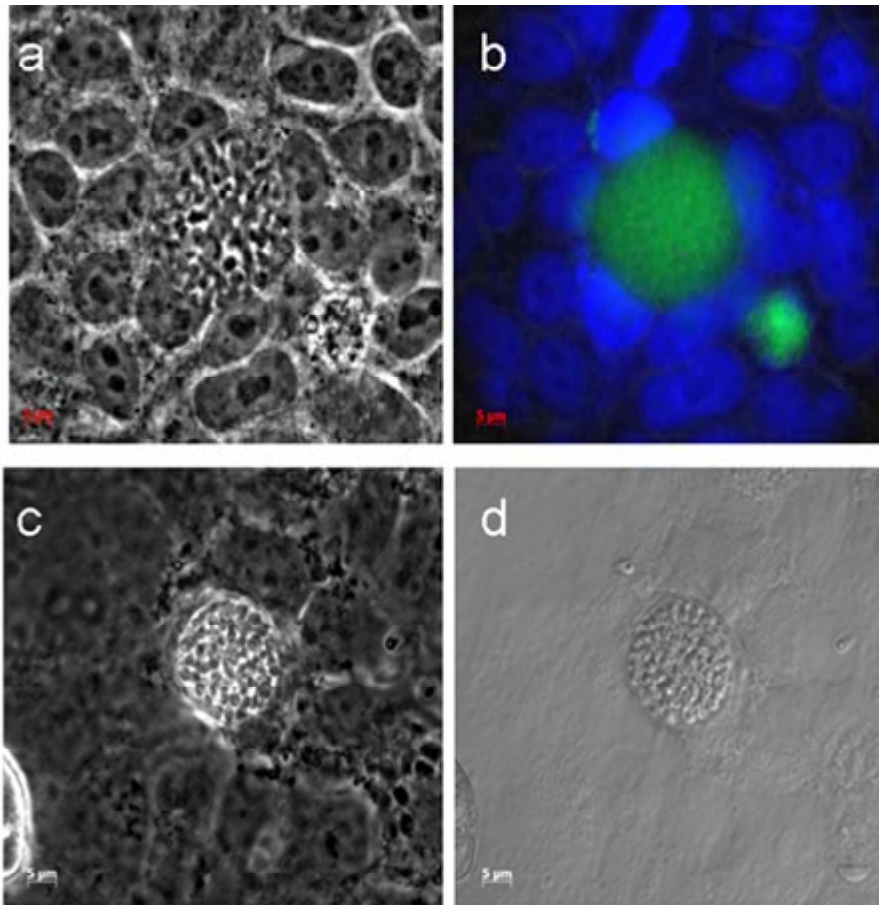
*gondii* carece de la enzima necesaria para sintetizar arginina *de novo* por lo que requiere tomar este aminoácido de la célula huésped. Al incrementar los niveles intracelulares de GMPc y AMPc de manera permanente o transitoria se ha demostrado que se puede inducir la diferenciación de *T. gondii* en la cepa PLK mas no en la RH (13).

**Conversión espontánea.** La transición de taquizoítos a bradizoítos puede ocurrir de manera espontánea, sin la necesidad de aplicar algún factor de estrés, sin embargo esto ocurre con una baja frecuencia. El grado de diferenciación varía de una cepa a otra. Recientemente se han descrito cambios en la fase pre-mitótica del ciclo celular, sobretodo en la fase G2 que se ha asociado con la diferenciación a bradizoítos (14). Es tema de controversia si la estirpe de la célula huésped es determinante para la interconversión de *T. gondii*. Los fibroblastos humanos son los más utilizados para estudiar el fenómeno de diferenciación. Recientemente se han hecho ensayos con células de músculo esquelético que se diferencian *in vitro* a miotubos, en los que se ha obtenido una alta frecuencia de conversión espontánea a bradizoítos a partir del sexto día post-invasión (6). Para la inducción de la formación de quistes de *T. gondii* por estrés se han utilizado diferentes líneas celulares como células Vero, fibroblastos humanos, macrófagos murinos, neuronas de rata, astrocitos y microglia, las cuales se han invadido con diferentes cepas de *T. gondii* como RH, ME 49, NTE, PLK, VEG y algunas cepas exóticas como: COUG, CAST, GPHT, MAS, FOU (6).

#### **Morfología y proteínas estructurales de superficie de bradizoítos y quiste tisular**

La diferenciación *in vitro* de *T. gondii* mediante los métodos anteriormente descritos ha permitido conocer la mor-

fología y biología de bradizoítos y quistes tisulares. Mediante el estudio de estas poblaciones de baja virulencia se ha podido determinar que los bradizoítos son una forma parasitaria intracelular de poca motilidad, baja virulencia y lenta proliferación los cuales, al igual que los taquizoítos, también se dividen por endodiogenia y transforman a la célula huésped infectada en un quiste tisular. Dentro de las características de los bradizoítos se encuentran la presencia abundante de gránulos conteniendo polisacáridos como la amilopectina, su núcleo ubicado en la parte posterior, roptrías, numerosos micronemos así como su baja motilidad y capacidad replicativa. Una propiedad adicional es su capacidad para unirse a la lectina de *Dolichos biflorus* debido a la presencia de polisacáridos en la pared del quiste (15). La figura 1 muestra quistes de *T. gondii* de ocho días obtenidos a partir de la cepa Prugniaud en células Hep-2 teñidos con la lectinas de *D. biflorus* fluorescente. El quiste tisular mide entre 50 a 70 µm y puede contener entre 1000 y 2000 bradizoítos. El tamaño del quiste depende tanto del tipo de la célula huésped, como de la edad del quiste. En los tejidos del huésped, los quistes inmaduros pueden llegar a medir hasta 5 µm y contener 2 bradizoítos en su interior. Una VP, en su formación temprana, puede contener taquizoítos o bradizoítos. La identificación de bradizoítos y de estructuras quísticas, es posible mediante técnicas histoquímicas que detecten marcadores específicos de bradizoítos y de la pared del quiste. Los bradizoítos desarrollan quistes en diversos tejidos, pero son más comunes en tejido nervioso y muscular, sin embargo no queda claro cual es la célula o tejido preferidos para esta interconversión. En bradizoítos no se observan cuerpos lipídicos, muestran reacción positiva a la tinción de ácido peryódico de



**Figura 1.** Quistes de *T. gondii* (cepa Prugniaud) en células Hep-2 mostradas por: **a**, contraste de fases (quiste en célula huésped); **b**, contraste de fases de quiste en célula huésped teñido con lectina *Dolichos biflorus* (verde) y con DAPI para el núcleo de célula huésped (azul); **c**, contraste de fases, quiste en sobrenadante; **d**, quiste por Nomarsky (creado por Rivera y Mondragón, 2008).

Schiff y resisten más las condiciones de ácido-pepsina (sobreviviendo hasta 2 horas en pepsina-HCl). Aparentemente la pared del quiste se forma a partir de la yuxtaposición de la membrana de la VP y de la membrana de la célula huésped, con la presencia de filamentos intermedios que lo rodean y que no están incorporados a la pared del quiste (11). Mediante el uso de antisueros policlonales se demostró que los taquizoítos son antigénicamente diferentes a los bradizoítos y que existen antígenos estado-específicos, identificados por técnicas de Western blot y ELISA. La mayoría de los antígenos identificados hasta el momento pertenecen a dos diferen-

tes familias: SAG1 y SAG2 ("surface antigens"). La familia SAG1 incluye a SAG3, (BSR)4 ("bradyzoite specific recombinant"). Las proteínas SRS 1-3

(SAG-"related sequences"), SAG5, SAG5.1 y SAG5.2 (13). SAG1 y SRS1-SRS3 están presentes únicamente en taquizoítos, BSR4 sólo en bradizoítos y SAG3 en ambos. Esta familia de proteínas juega un papel importante en el proceso de adhesión del parásito a la célula blanco. La familia SAG2 incluye a SAG2A, SAG2B, SAG2C y SAG2D. SAG2A y SAG2B, las cuales se expresan exclusivamente en taquizoítos, mientras que SAG2C y SAG2D en bradizoítos. Las enzimas y el metabolismo bioquímico de los bradizoítos no se han estudiado en detalle debido a la dificultad para obtenerlos en cantidad suficiente *in vitro*. Al utilizar técnicas de biología molecular se han podido identificar diferentes enzimas como las enolasas de taquizoítos y bradizoítos, la glucosa-6- fosfato isomerasa y la lactato deshidrogenasa (LDH) (11). Se ha demostrado que los bradizoítos poseen una ATPasa que está ausente en los taquizoítos (16). Algunas moléculas de bradizoítos y su distribución topográfica se muestran en la Tabla 1.

### Conclusión

La fase de quiste tisular protege al parásito *Toxoplasma gondii* de la acción efectora del sistema inmune del huésped así como de la acción de la

TABLA 1

#### Moléculas de bradizoítos y su distribución topográfica (4)

Nombre de antígeno	Distribución por inmunofluorescencia
BAG1 (hsp30)	Citoplasma
BAG5	Citoplasma
BSR4	Superficie
SAG4 (antígeno de superficie)	Superficie
MAG1 (antígeno de matriz)	Matriz
CST1 (proteínas de pared del quiste)	Pared del quiste

BAG = antígeno de bradizoíto

gran mayoría de los compuestos toxoplásmicos como pirimetamina, sulfadiazina y atovacuona. Al entender mejor los eventos bioquímicos y moleculares que se llevan a cabo durante el proceso de cistogénesis de *Toxoplasma gondii* y caracterizar los componentes moleculares que constituyen al quiste y a los bradizoítos, se podrán desarrollar nuevos compuestos químicos con actividad toxoplásmica que permitan el planeamiento de terapias alternativas en el tratamiento de la encefalitis toxoplásmica así como su caracterización inmunológica para la aplicación de estrategias de inmunoprotección contra este parásito.

## REFERENCIAS

1. McFadden DC, Camps M, Boothroyd JC (2001) Resistance as a tool in the study of old and new drug targets in *Toxoplasma*. *Drug Resist Updat* 4:79-84.
2. Luft BJ, Remington JS (1992) Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 15:211-222.
3. Sibley D, Krahenbuhl J, Adams M, Weidner E. (1986) *Toxoplasma* modify macrophages phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J Cell Biol* 103:867-874.
4. Weiss LM, Kim K (2001) The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front in Biosci* 5:d391-405.
5. Filisetti D, Candolfi E (2004) Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Sup Sanità* 40(1):71-80.
6. Fonseca M da F, Barbosa HS, Grob U, Luder KG (2008). Stress related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol Bio Syst* 4:824-834.
7. Dzierszinski F, Nishi M, Ouko L, Roos DS (2004) Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eukaryotic Cell* 3:992-1003.
8. Bohne W, Holpert M, Gross U (1999) Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology* 201:248-254.
9. Soete M, Dubremetz JF (1996) *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion in vitro. *Curr. Top Microbiol Immunol* 219:76-80.
10. Lang C, Groß U, Lu CGK (2007) Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 100:191-203.
11. Lekutis C, Ferguson D, Boothroyd J (2000) *T. gondii*: Identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp Parasitol*. 96:89-96.
12. Fox BA, Gigley JP, Bzik DJ (2004) *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int J Parasitol* 34:323-331.
13. Kirkman LA, Weiss LM, Kim K (2001) Cyclic nucleotide signaling in *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation. *Infect Immun* 69:148-153.
14. Radke JR, Gierini MN, Jerome M, White MW (2003) A change in the premitotic period of the cell cycle is associated with bradyzoite differentiation in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 131:119-127.
15. Fortier B, Coignard-Chatain C, M. Soete, Dubremetz JF (1996) Structure and biology of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *Seances Soc Biol Fil* 190:385-94.
16. Dubey JP (1997) Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* 44:592-602.