

ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DO PROCESSO DE DIVISÃO DO TOXOPLASMA GONDII

Wanderley de Souza *

Neste trabalho é feita uma revisão sobre alguns aspectos biológicos do Toxoplasma gondii, principalmente sobre a ultraestrutura da forma interfásica e as modificações ultraestruturais que ocorrem no parasito durante o seu processo de divisão.

Considera-se inicialmente o processo de divisão binária admitindo-se, porém, a possibilidade de que as imagens interpretadas como sendo de divisão binária representem estágios da divisão por endodiogenia.

Quanto à endodiogenia descrevem-se as alterações que ocorrem na "parasito mãe" durante o processo de formação dos dois "parasitos filhos". Este processo é semelhante no Toxoplasma gondii, Besnoitia jellisoni, Sarcocystis tenella e Frenkelia. Discute-se a possibilidade da formação de mais de dois "parasitos filhos" por um processo de endopoligenia, bem como o processo de esquizogonia. Os resultados mais recentes mostram que não existe esquizogonia nas formas vegetativas do Toxoplasma gondii, sendo que as imagens interpretadas como tal, ao microscópio ótico, são o resultado de endodiogenias sucessivas em que os endozoítas formados permanecem ligados entre si pela região posterior. A esquizogonia é, no entanto, encontrada nas formas que se desenvolvem no interior de células epiteliais do intestino do gato, que é o hospedeiro definitivo do Toxoplasma gondii. Discute-se o conceito de esquizogonia, comparando-o em três protozoários: Eimeria bovis, E. callospermophili e Plasmodium juxtannucleare, que apresentam diferenças entre si quanto ao processo de iniciação da individualização dos "parasitos filhos". Refere-se à recente hipótese que considera a endodiogenia como o processo fundamental de divisão dos esporozoários, ocorrendo na fase final da esquizogonia.

Finalmente é acentuado o papel que a microscopia eletrônica aliada às modernas técnicas de citoquímica e imunocitoquímica poderá desempenhar no sentido de um melhor conhecimento da biologia do Toxoplasma gondii e da fisiopatogenia da Toxoplasmose.

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii, agente etiológico da toxoplasmose, foi descoberto em 1908 independentemente por Splendore em São

Paulo e por Nicolle et Manceaux em Tunis. Durante muito tempo discutiu-se a sua posição taxonômica; recentemente foi incluído entre os coccídeos. Ele foi inicialmente considerado como um protozoário

* Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas. Laboratório de Cultura de Tecidos e Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biofísica da U.F.R.J., Centro de Ciências Médicas — U.F.R.J., Cidade Universitária Rio de Janeiro — GB.
Recebido para publicação em 29.12.1973.

com ciclo de vida simples, apresentando formas vegetativas obrigatoriamente intracelulares. No entanto, os resultados recentes mostram que o seu ciclo de vida é complexo, apresentando formas esquizogônicas e gametogônicas que se desenvolvem no epitélio do intestino do gato, levando à formação de oocistos que são liberados pelas fezes desse animal (10, 20).

Os primeiros estudos realizados com o *Toxoplasma* mostraram que ele necessita de uma célula hospedeira para a sua sobrevivência e apresenta um comportamento semelhante ao apresentado por alguns vírus (40). Diversos estudos foram feitos com o objetivo de explicar a razão desta dependência do parasito pelo citoplasma de uma célula hospedeira.

Várias tentativas foram feitas no sentido de se encontrar um meio no qual o *Toxoplasma* pudesse ser cultivado, e que permitisse a obtenção de quantidades suficientemente grandes de parasitos, que possibilitassem a realização de estudos bioquímicos. Infelizmente todas as tentativas realizadas até o momento, visando à obtenção de um meio sintético para o cultivo do *Toxoplasma*, foram negativas. Nessas tentativas foram utilizados meios usualmente aplicados ao cultivo de bactérias, fungos e protozoários. Destaque especial deve ser dado à verificação inicial feita por Levaditi *et al* (23) de que o *Toxoplasma* existente em fragmentos de cérebro de pintos e pombos com toxoplasmose, poderia infectar tecidos normais colocados em íntimo contato com o tecido parasitado num sistema de cultura de tecidos. Meyer *et al* (3, 15, 26, 32) confirmaram esses resultados e, aperfeiçoando a técnica, mostraram que o *Toxoplasma* pode ser mantido indefinidamente em culturas de tecido. Com esta técnica estudaram a penetração do parasito na célula, sua multiplicação, formação de rosáceas e rompimento da célula hospedeira, liberando parasitos para o espaço intercelular. Estes aspectos podem ser melhor apreciados no recente estudo microcinematográfico, em contraste de fase, realizado por Meyer e de Oliveira Musacchio (32). Tomando por base os trabalhos iniciais de Meyer *et al*, grande número de autores passou a utilizar a cultura de tecidos como um modelo de toxoplasmose experimental, quer para estudos imunológicos, quer para teste de

substâncias com possível ação letal sobre o parasito. Com a evolução da técnica de cultura de tecidos surgiu a cultura de células isoladas por tripsinização e que passou a ser também utilizada para o cultivo do *Toxoplasma*.

Logo no início do desenvolvimento da microscopia eletrônica, esta técnica foi aplicada ao estudo do *Toxoplasma*. Meyer e de Andrade Mendonça (27), realizaram as primeiras observações do parasito *in toto*. No entanto, devido à espessura do parasito, não havia suficiente penetração do feixe eletrônico de modo que pouca informação pode ser obtida. Posteriormente Gustafson *et al* (16) e outros autores (4, 5, 11, 12, 21, 22, 28, 31, 33, 34, 37, 43, 45, 50, 51, 54-56) utilizando a técnica dos cortes ultrafinos, mostraram que o *Toxoplasma* não só apresenta praticamente todas as estruturas conhecidas em outros protozoários, como também dispõe de estruturas que lhe são características. A utilização recente das técnicas de biologia celular ao estudo do *Toxoplasma* tem fornecido alguns dados, ainda que preliminares, mas que começam a elucidar algumas das dúvidas ainda existentes.

Inicialmente acreditou-se que o *Toxoplasma* se dividia pelo processo de fissão binária, tal como ocorre em vários protozoários. Foi também descrito um processo de divisão nuclear múltipla, do tipo esquizogônico. Mais recentemente observou-se um tipo especial de divisão em que se formam dois parasitos filhos dentro do parasito mãe. Tal processo é chamado de endodiogenia. Nas observações usualmente realizadas em esfregaços, cortes histológicos e mesmo *in vitro* em culturas de tecido, com o microscópio de contraste de fase, não é possível se obter uma idéia completa do processo de divisão. No caso particular da divisão por endodiogenia descrita por Goldman *et al* (13, 14), as imagens são convincentes devido à técnica especial de impregnação pelo proteinato de prata, usada pelos autores.

Certamente só a microscopia eletrônica pode esclarecer, até certo ponto, o processo de divisão do *Toxoplasma*. Como este processo envolve modificações ultraestruturais do parasito é indispensável uma descrição, ainda que resumida, da ultraestrutura do *Toxoplasma gondii* na sua forma interfásica.

ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DO *TOXOPLASMA GONDII*

Ao microscópio ótico observa-se que o *Toxoplasma* tem uma forma de "banana". O seu comprimento varia entre 4-8 μm ; a sua largura, em torno de 2-4 μm (Fig. 1 e 2).

a) *Envoltório do parasito* — O *Toxoplasma* é envolvido por um sistema de membranas constituído por uma membrana externa de natureza trilaminar cuja espessura é de 70-80 Å e que o envolve completamente. Logo abaixo, a uma distância variável (entre 100-200 Å, encontra-se uma membrana média cuja espessura é de 180 Å e que não envolve completamente o parasito, estando interrompida na porção mais apical da região anterior (complexo apical) e ao nível de uma estrutura existente na parte lateral do parasito que tem sido designada por citóstomo. Ao nível dessa estrutura, a membrana externa sofre apenas uma pequena depressão. Segundo Vivier e Petitprez (52) a membrana interna é na realidade constituída por duas, uma média e uma interna; as duas permanecem sempre juntas, havendo um espaço entre elas variável em torno de 25 a 75 Å. Tanto a membrana média como a interna, apresentam estrutura trilaminar cuja espessura é de 75 Å. Como estas duas membranas estão sempre juntas, o termo membrana interna será utilizado para designá-las.

Um citóstomo é hoje considerado como uma abertura no corpo celular, visível ao microscópio ótico, através do qual o parasito se alimenta (24). A estrutura observada no *Toxoplasma*, apresentando pequenas dimensões (0,04 — 0,05 μm de diâmetro por 0,15 μm de profundidade) não é visível ao microscópio ótico e nem o seu papel na ingestão de alimentos está perfeitamente demonstrado; portanto não se enquadra na definição de citóstomo. Ela é também chamada por alguns autores de "micropyle", denominação essa que devia ser utilizada apenas para designar uma abertura (ou posição de abertura) existente na parede de um oocisto. O termo mais correto para designar essa estrutura no *Toxoplasma* seria "micropore", definido por Levine (24) como sendo uma abertura lateral de um esporozoita ou outros estágios encontrados em protozoários de sub-

filo Apicomplexa, visível apenas com o microscópio eletrônico e utilizado em alguns parasitos para a ingestão de alimentos. Estudos de Rudzinska *et al* (39), Aikawa *et al* (1) em parasitos da malária, demonstram que esta estrutura é utilizada para a ingestão de material da célula hospedeira (hemácea) que pode ser facilmente distinguido do citoplasma do parasito devido a alta densidade eletrônica do citoplasma da hemácea. No entanto, no caso do *Toxoplasma* ainda não foi possível demonstrar que este fenômeno também ocorra, embora sejam encontradas no citoplasma do parasito certas estruturas que correspondem aos vacúolos digestivos existentes nos parasitos da malária.

b) *Região Anterior (complexo apical)* —

Nessa região encontra-se uma estrutura cilíndrica, o conóide, constituída por 3 anéis polares. Partindo do anel polar inferior originam-se 22 microtúbulos que, dispondo-se na periferia, logo abaixo da membrana interna, projetam-se para a região posterior do parasito onde terminam livremente (4). Esses microtúbulos podem alcançar um comprimento em torno de 8 μm . Apresentam uma espessura variável entre 180-230 Å, com estriações transversais cuja periodicidade é de cerca de 80 Å. Os microtúbulos foram interpretados como sendo de natureza contrátil e responsáveis pela movimentação do parasito, principalmente quando ele está fora da célula, no espaço intercelular, procurando penetrar no interior de uma nova célula hospedeira. Nas preparações em que se utiliza a técnica de inclusão e corte ultrafino os microtúbulos nem sempre podem ser bem visualizados. A técnica mais indicada para a sua visualização é a de coloração negativa, com ácido fosfotúngstico, aplicada a uma suspensão de parasitos íntegros ou submetidos a choque osmótico (4) (Fig. 5).

Já pela técnica dos cortes é possível ver que o conóide é constituído por 3 anéis polares, apresentando uma estrutura quadriculada (Fig. 2). Quando examinado pela técnica de coloração negativa verifica-se que os microtúbulos que têm origem no primeiro anel polar, projetam-se também para a parte superior do conóide de modo a se cruzarem, conferindo ao conóide o aspecto quadriculado acima mencionado. Os microtúbulos encontram então o segun-

do anel polar e daí projetam-se para o terceiro anel polar (porção mais anterior do conóide), na parede da qual parecem estar dispostos paralelamente e em íntimo contato. Dessa forma, podemos considerar o conóide como uma estrutura cilíndrica cuja parede é constituída por microtúbulos (5) (Fig. 7). Em algumas ocasiões observa-se junto ao conóide a presença de vesículas do tipo pinocitótico, sugerindo a existência de um processo de pinocitose nessa região (55).

Além do conóide encontram-se na região anterior, várias estruturas eletrodensas, delimitadas por membrana. Apresentam uma base mais larga, localizada na região média do parasito, e se afinam à medida que se dirigem para a região anterior, chegando a penetrarem no conóide (Fig. 2 e 7). Algumas vezes elas apresentam um aspecto vesicular. Estruturas semelhantes têm sido encontradas em grande número de parasitos, recebendo diferentes denominações. Gustafson *et al* (16) ao descrevê-las pela primeira vez no *Toxoplasma*, chamaram-nas de toxonemas, pensando serem elas estruturas características do *Toxoplasma*. No entanto, estruturas semelhantes foram descritas posteriormente em outros protozoários onde receberam designações tais como corpos densos, lankesteronemas, eimerionemas e organela pareada, sendo esta última denominação muito utilizada para os parasitos da malária, por apresentarem apenas duas destas organelas (41). Mais recentemente tem sido utilizado o termo roptria para designá-las numa tentativa de uniformização (24). Sheffield e Melton (50) descrevem no *Toxoplasma* a existência de certas estruturas também localizadas na região anterior; são chamadas de micronemas. Segundo eles tais estruturas devem estar relacionadas com as roptrias ou mesmo, como aceito pela maioria dos autores, serem estágios diferentes de uma mesma organela.

O papel funcional das roptrias ainda não está suficientemente esclarecido. Segundo alguns autores elas estão relacionadas com o processo de penetração do parasito. Alguns trabalhos têm mostrado que, quando se adiciona hialuronidase ou lisosima ao meio de cultura para o cultivo de células e as infecta com *Toxoplasma*, o número de parasitos que penetram nas

células corresponde ao dobro da situação controle. Esse fato apoia a idéia de que o *Toxoplasma* no seu processo de penetração ativa, lance mão de substâncias com ação semelhante à da hialuronidase (25). Como a única estrutura existente no *Toxoplasma* que tem um aspecto de secreção são as roptrias, e levando-se em consideração a sua localização, admite-se que elas sejam reservatórios de substâncias proteolíticas. Estudo citoquímico recente, com o uso do microscópio eletrônico, demonstra a presença de mucopolissacarídeos e fosfatase ácida nestas organelas (55). Em trabalho recente, sugerimos que o *Toxoplasma* penetra no interior das células liberando substâncias proteolíticas existentes nas roptrias, graças a uma contração dos microtúbulos, que constituem a parede do conóide, que desempenharia o papel de um esfíncter (5). Embora neste caso estejamos raciocinando em função de um mecanismo ativo de penetração, não excluimos a possibilidade, sem dúvida alguma existente, que também haja penetração passiva do parasito, isto é, através de um processo de fagocitose por parte da célula (22).

c) *Outras Regiões* — O núcleo do *Toxoplasma* está localizado na região central com tendência à região posterior. É de forma mais ou menos esférica e envolvido por dupla membrana que apresenta poros. A cromatina encontra-se espalhada por todo o núcleo; um ou dois nucléolos podem ser vistos às vezes localizados no centro, e às vezes acolados à membrana nuclear (Fig. 2). Recentemente foi descrita a presença de um centríolo, constituído por 9 microtúbulos periféricos e uma estrutura tubular central, e localizada na região anterior, próximo ao núcleo (55). Tal ocorrência foi por nós confirmada (Meyer e de Souza, dados não publicados). Este centríolo é semelhante ao descrito em *Eimeria necatrix* durante o seu desenvolvimento esquizogônico no epitélio intestinal da galinha doméstica (7, 8). Em formas proliferativas intracelulares do *Toxoplasma* em culturas de tecido encontramos a presença de uma placa eletrodensa semelhante à descrita em parasitos da malária (Meyer e de Souza, dados não publicados) de onde partiam vários microtúbulos que pareciam constituir um fuso.

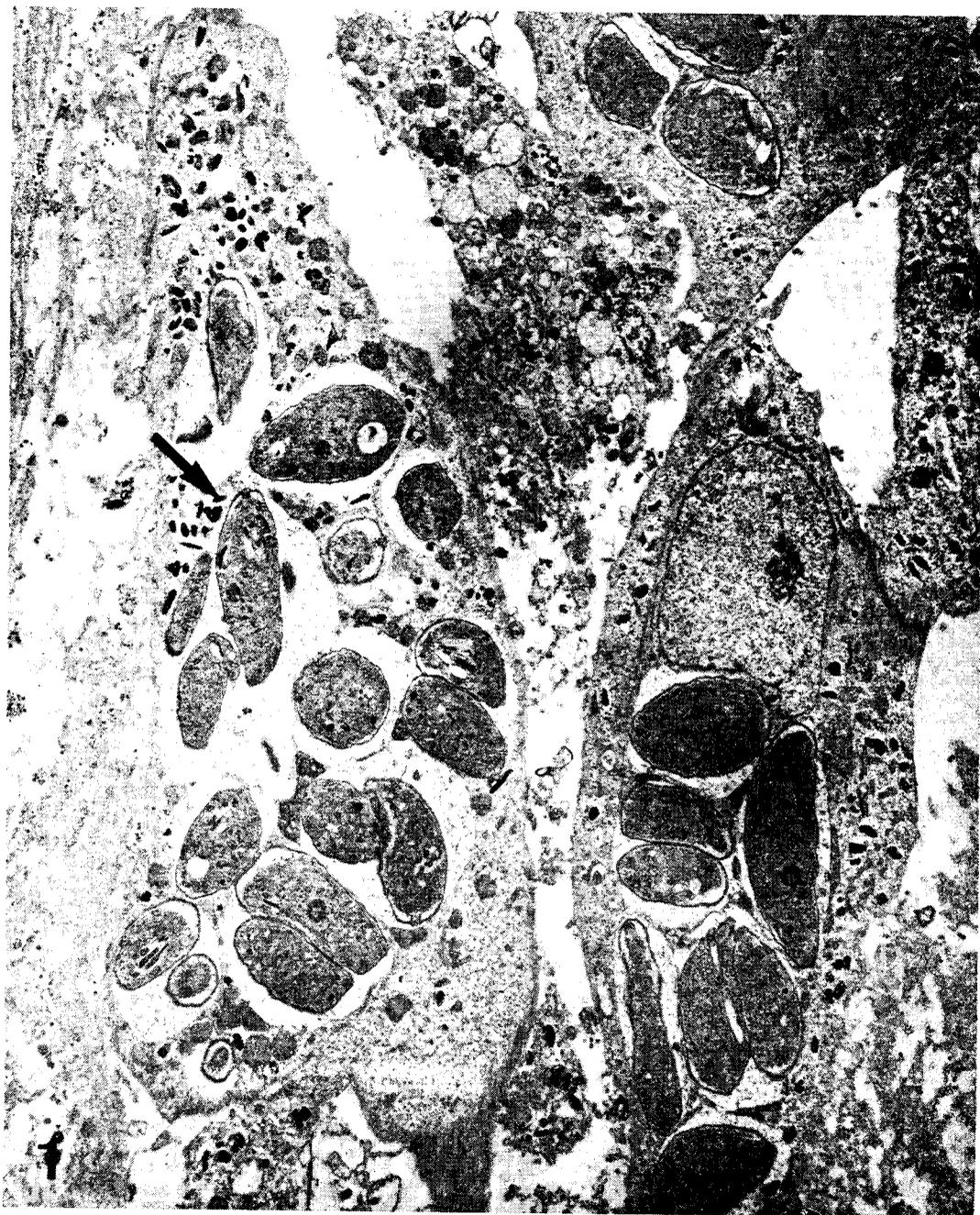


Figura 1 — Toxoplasmas no citoplasma de células do epitélio pigmentar da íris de embrião de pinto mantido em culturas de tecido. Os parasitos se multiplicam nos vacúolos citoplasmáticos da célula hospedeira de maneira desordenada, sem formarem rosáceas. No citoplasma da célula hospedeira observa-se a presença de grânulos eletrodensos que correspondem aos grânulos de melanina existentes na célula pigmentar.

Material fixado em glutaraldeído 2,5% e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%.

Aumento: 3.750 x

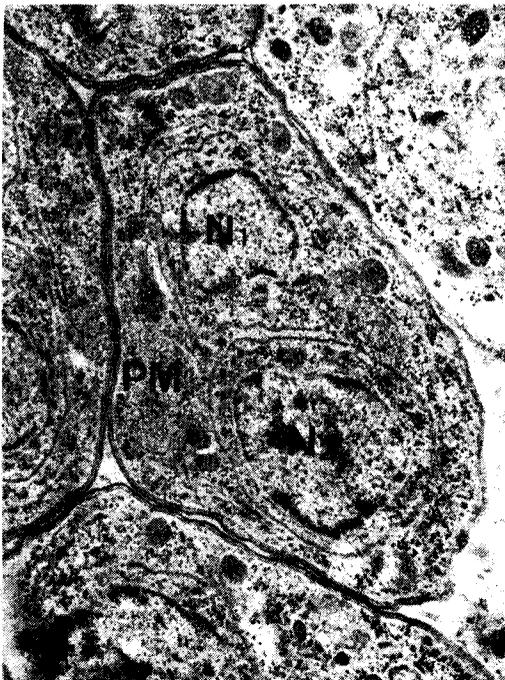
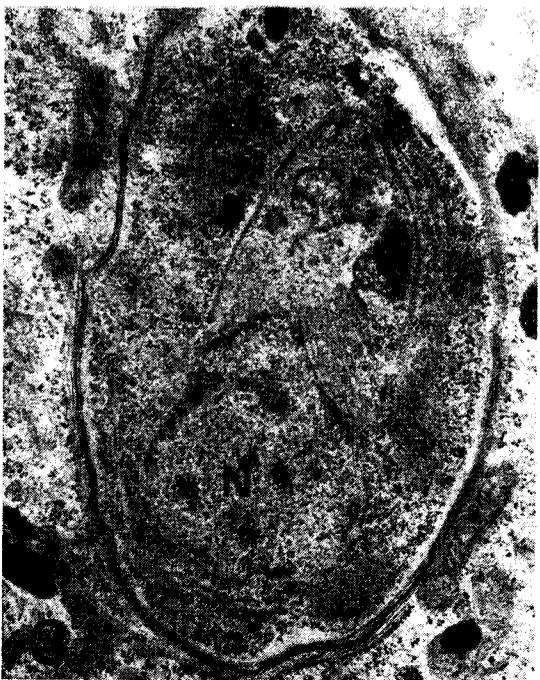
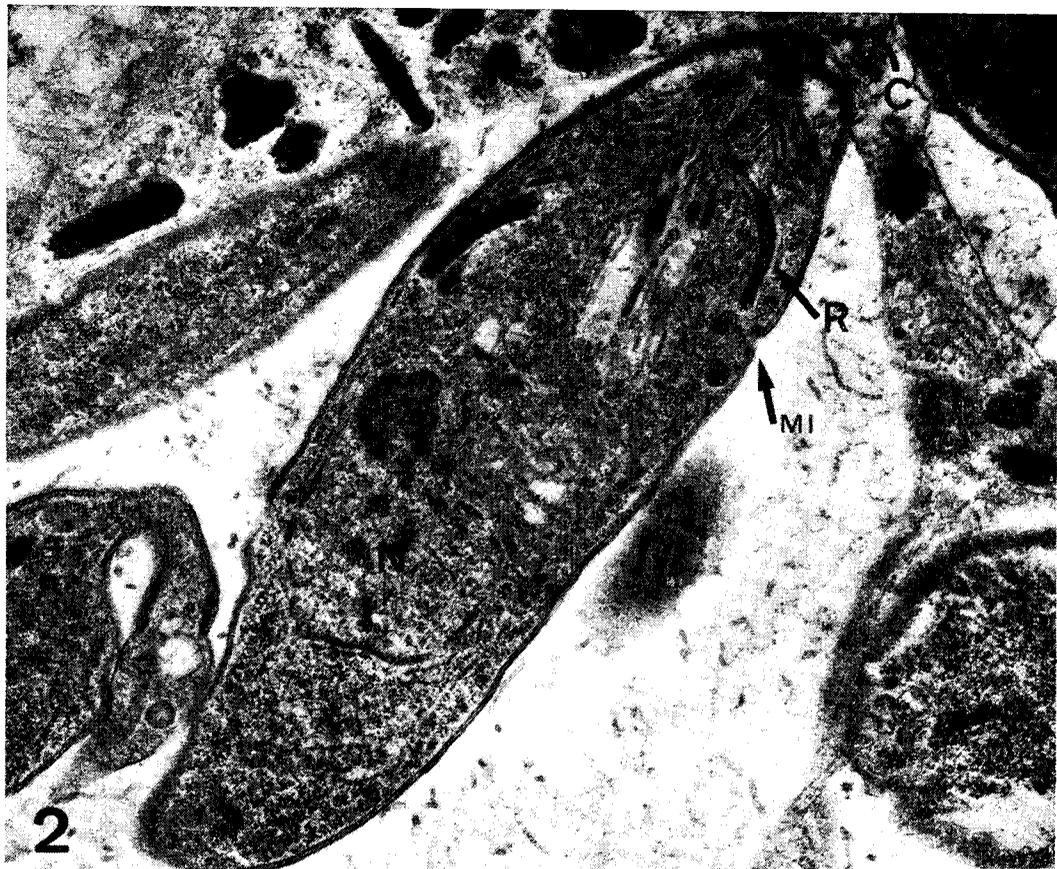


Figura 2 — Maior aumento da região assinalada na figura anterior (→) mostrando um *Toxoplasma* em corte longitudinal. Vê-se o conoide (C), "micropore" (MI), estruturas eletrondensas correspondente às Roptrias (R), Núcleo (N) e Citoplasma. Aumento: 25.000 x.

Figura 3 — *Toxoplasma* em divisão mostrando a formação da membrana espessa (seta) logo acima do núcleo do parasito (N). Aumento: 20.000 x.

Figura 4 — Corte transversal do *Toxoplasma* em divisão. Observa-se a presença de dois núcleos (N_1 e N_2) incorporados a dois "parasitos filhos" que já estão delimitados por uma membrana (setas), permanecendo no interior do "parasito mãe" (PM). Aumento: 20.000 x.



Figura 5 — 2 *Toxoplasma* submetidos a choque osmótico e preparado pela técnica de coloração negativa com o ácido fosfotungstico (4, 5). Observa-se o complexo arranjo de microtúbulos (MT) constituindo o conoide (C). A partir do primeiro anel polar do conoide (AP) 22 microtúbulos (MT) projetam-se para a região posterior do parasito.

Aumento: 60.000 x.

Situado na região anterior do parasito e próximo ao núcleo, observam-se os sáculos e vesículas que constituem o complexo de Golgi. A sua localização nessa região tem duas implicações importantes: uma está ligada a seu papel secretor e que estaria relacionado com as roptrias, e a outra, ao seu papel na formação de membranas celulares e que teria relação com o processo de divisão do parasito, como será explicado oportunamente.

Além dessas estruturas descritas, o *Toxoplasma* apresenta um retículo endoplasmático predominantemente do tipo rugoso e localizado lateral e posteriormente ao núcleo. Ribossomos livres encontram-se distribuídos uniformemente por todo o citoplasma. Observa-se, também, a presença de mitocôndrias que apresentam cristas do tipo tubular, como encontradas em outros protozoários. Também se observam no citoplasma certos grânulos densos, vesículas plurimembranasas, vacúolos e grânulos de paraglicogênio, cujo significado fisiológico não está estabelecido. Há também certas estruturas que aparecem durante a divisão e que serão oportunamente descritas (Fig. 6).

DIVISÃO DO TOXOPLASMA

A maneira pela qual o *Toxoplasma* se multiplica tem sido motivo de grande discussão. Sempre prevaleceu a idéia de que ele se dividia pelo processo de fissão binária. Pereira de Castro verificou que em cultura de tecidos ocorre divisão esquizogônica e observou casos em que 32 núcleos haviam sido formados sem a divisão do citoplasma (35). Estudando o *Toxoplasma* em líquido peritoneal, através de métodos de impregnação pela prata, Goldman *et al* (13, 14) descreveram para o *Toxoplasma gondii* e *Besnoitia jellisoni* um processo em que havia a formação de dois parasitos filhos dentro de um, que eles denominaram de endodiogenia. O mesmo processo de divisão foi também descrito nas formas císticas do *Sarcocystis tenella* (44), onde além disso ocorre divisão binária, e em *Frenkelia* (M-Organism) (43).

Sheffield e Melton (50), estudando o *Toxoplasma* em cultura de células, ao microscópio eletrônico, sugerem que a endodiogenia seja o único processo de divisão que ocorre no *Toxoplasma*. Olisa (34) es-

tudando o *Toxoplasma* no exsudato peritoneal, encontrou reprodução por fissão binária bem como um processo de divisão múltipla do núcleo, semelhante à esquizogonia. Ela também descreveu um outro processo em que o parasito libera numerosas "células" contendo pequenos corpos aparentemente de origem nuclear. Ela sugere que este é um importante processo de reprodução, em que os corpos chamados de "morulae" são liberados na região do conóide. No entanto, este processo de divisão não encontra nenhum apoio na literatura sobre o assunto. Ela não encontrou imagens que sugerissem uma divisão por endodiogenia.

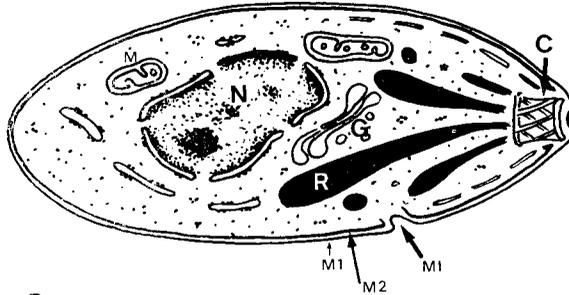
Resumindo podemos dizer que de um modo geral três tipos de divisão podem ser considerados para o *Toxoplasma*: (a) o processo de fissão binária, (b) endodiogenia e (c) a esquizogonia. A seguir será descrito cada um destes processos.

DIVISÃO BINÁRIA

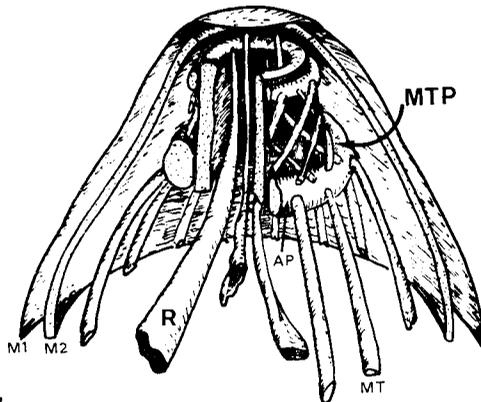
Este era o tipo de divisão aceito pela maioria dos autores, antes dos trabalhos de Goldman *et al* (13, 14), descrevendo a endodiogenia. Segundo alguns autores, como Sheffield e Melton, tal tipo de divisão não ocorre no *Toxoplasma*.

É um processo de divisão onde há inicialmente uma divisão nuclear e a seguir, a divisão do citoplasma que ocorre graças a uma invaginação da membrana celular, com conseqüente formação de dois parasitos filhos que então se separam. Um exemplo típico é o que ocorre com as formas amastigotas intracelulares do *Trypanosoma cruzi*.

Segundo Vivier e Petitprez (52), no caso do *Toxoplasma* é apenas a membrana interna do parasito que se invagina e se insinua ao nível da constrição nuclear. A membrana externa permaneceria íntegra. Com a evolução do processo haveria uma situação semelhante ao que ocorre na endodiogenia, isto é, a existência de dois "parasitos filhos", delimitados por uma membrana espessa e envolvidos pela membrana externa do "parasito mãe". Os dois parasitos recém-formados, ao se liberarem, receberão a sua membrana externa de maneira semelhante ao que ocorre na endodiogenia.



6



7

Figura 6 — Esquema do Toxoplasma em interfase, mostrando a membrana externa (M_1) e a interna (M_2), o "micropore" (M_1), núcleo (N), complexo de Golgi (G), mitocôndria (M), róptrias (R) e o conoide (C).

Figura 7 — Esquema que mostra o complexo apical do Toxoplasma. M_1 e M_2 representam as membranas externa e interna, respectivamente. O conoide (C) é visto como uma estrutura cilíndrica, cuja parede é constituída por microtúbulos (MTP). No interior do cilindro penetram as porções terminais das róptrias (R). Partindo do anel polar inferior do conoide (AP) saem os microtúbulos que projetam-se para a região posterior do parasito (MT).

Ainda não está claro se o processo de divisão binária realmente ocorre no *Toxoplasma*. É possível que as imagens interpretadas como sendo uma divisão binária representem estágios de divisão por endodiogenia.

ENDODIOGENIA

O primeiro sinal de que o parasito vai entrar em divisão por endodiogenia é o aparecimento de duas zonas de Golgi, separadas e próximas à superfície anterior do núcleo. Sheffield e Melton (50) observaram próximo ao complexo de Golgi uma estrutura ovoide, homogênea, medindo aproximadamente 0,28-0,48 μm por 0,8-1,0 μm , sendo envolvida por várias membranas. Tal estrutura é chamada de adjunto de Golgi. Às vezes é observado um aspecto de constricção nessa estrutura, sugerindo que ela se divide transversalmente. O par resultante se separa e as duas estruturas permanecem lateralmente situadas em relação ao núcleo. É possível que esta estrutura só exista nos parasitos em divisão.

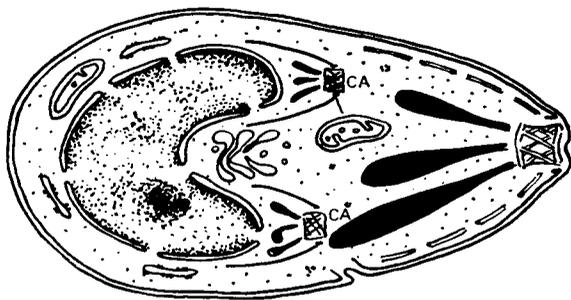
Anteriormente ao núcleo aparecem uma ou mais estruturas circulares, de aspecto denso, envolvidas por membrana e com um diâmetro de cerca de 0,3 μm . Essas estruturas apresentam no seu interior áreas de menor eletrondensidade. É possível que representem os precursores das roptrias encontradas nos organismos filhos após se completar a divisão. Segundo Van der Zypen e Piekarski (56) nos dois polos anteriores do núcleo observa-se um corpo eletrondenso que foi identificado por métodos citoquímicos como sendo constituído por DNA, e chamado de "E-body" (E = endodiogenia). Segundo estes autores, este corpo seria o indutor do processo de endodiogenia, que, sendo precocemente liberado do núcleo, iria constituir a matriz dos futuros núcleos. Estruturas semelhantes foram encontradas por outros autores que as interpretaram como sendo fragmentos do nucléolo.

Quando o "parasito filho" começa a se formar, aparece na porção anterior do "parasito mãe" uma membrana espessa que será a futura membrana interna do endozoita em formação (Fig. 3 e 8). Ela se acha próxima ao núcleo, que a esta altura está formando uma invaginação na membrana da sua face anterior, assumindo

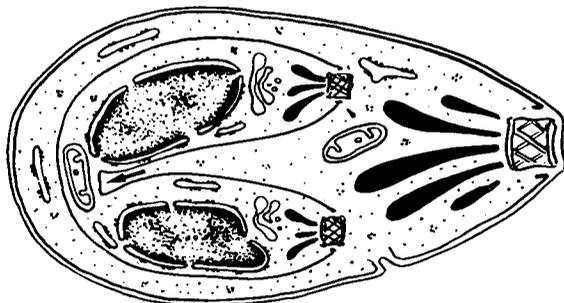
do assim uma forma bilobada. A membrana em formação se estende progressivamente no sentido posterior, à medida que o núcleo vai se estrangulando, englobando-o junto com porções citoplasmáticas do "parasito mãe" (Fig. 9). Já nas primeiras fases do aparecimento da membrana espessa observa-se a presença do conóide. Nesse primeiro estágio já há divisão do núcleo, que apresenta duas condensações cônicas que formam o polo nuclear. A membrana nuclear permanece intacta durante a divisão, exceto nessas áreas polares. Imagens semelhantes foram observadas em *Eimeria necatrix* onde foi demonstrada a existência de microtúbulos constituindo um fuso (7, 8). É possível que os microtúbulos que observamos em formas proliferativas do *Toxoplasma* e associados a uma placa eletrondensa, tenham sua origem no polo nuclear e constituam um fuso intranuclear (Meyer e de Souza, dados não publicados), à semelhança do que ocorre em outros protozoários (1, 6, 7, 8, 17, 19).

A medida que a membranas nuclear se invagina e a membrana espessa se aprofunda, os dois "parasitos filhos" vão tomando forma. Numa etapa posterior o núcleo se divide completamente e os dois parasitos já praticamente formados permanecem ainda ligados pela região posterior, separando-se posteriormente. Chegaremos a um estágio em que temos dois parasitos formados com todas as estruturas características do *Toxoplasma*, dentro do "parasito mãe" (Fig. 4). Nessa situação, às vezes se observa que o "parasito mãe" se apresenta em bom estado e com todas as organelas citoplasmáticas, inclusive o seu complexo apical.

Ainda não está claro o que acontece com os dois "parasitos filhos", dentro do "parasito mãe", até o momento de sua liberação. Caso a liberação ocorresse imediatamente, certamente restaria do "parasito mãe" considerável área citoplasmática. Quanto ao destino desta área temos duas possibilidades: a) se degeneraria, mas neste caso deveríamos encontrar dentro do vacúolo uma quantidade considerável de detritos celulares; b) segundo alguns autores, e o próprio Goldman *et al* (13, 14) em sua primeira descrição, há a possibilidade de que durante a divisão do núcleo ocorra a formação de três fragmentos nucleares. Nesse caso teríamos a possibili-



8



9

Figura 8 — Esquema que mostra uma fase inicial no processo de divisão por endodogenia. O núcleo do "parasito mãe" já apresenta uma invaginação. Logo acima de cada polo, aparece o esboço do complexo apical (CA, CA₂) dos "parasitos filhos" em formação.

Figura 9 — Fase mais adiantada do processo de divisão. Os dois "parasitos filhos" estão quase formados porém unidos entre si pelo polo posterior (→).

dade, considerada viável por Vivier (53, 54), de que, além da formação das duas células filhas o "parasito mãe", dispondo de organelas citoplasmáticas e do núcleo, pudesse após a liberação dos "parasitos filhos", continuar uma vida autônoma, sendo inclusive capaz de se reproduzir novamente. No entanto admitindo-se a ocorrência deste tipo de divisão deveríamos encontrar nos vacúolos citoplasmáticos números ímpares de parasitos. O que se observa, porém, em cultura de tecidos é que o número de parasitos no interior de um vacúolo é sempre par e que cada parasito se divide dando origem a dois parasitos, que também se dividem dando origem a quatro e assim sucessivamente. O mais provável é que após a formação dos dois "parasitos filhos", eles não sejam liberados imediatamente, permanecendo por algum tempo no interior do "parasito mãe", durante o qual eles aumentam de volume, de modo que ao se liberarem do "parasito mãe", este estivesse reduzido a pequena área que se desintegraria, dando origem às estruturas observadas no interior do vacúolo.

Em algumas ocasiões têm sido encontradas imagens em que se observa a presença de mais de dois núcleos dentro do parasito em divisão. Elas foram interpretadas por Vivier (53) como sendo um processo de divisão, em que há formação de mais de dois parasitos. Esse processo foi denominado de endopoligenia. Em nosso material imagens semelhantes foram também encontradas, porém, com baixa frequência (31).

O processo de liberação dos parasitos recém-formados foi estudado por Vivier e Petitprez (32) que demonstraram que os "parasitos filhos" recebem a sua membrana externa a partir da membrana externa do "parasito mãe", a medida que vão se liberando pela região do complexo apical (Fig. 11).

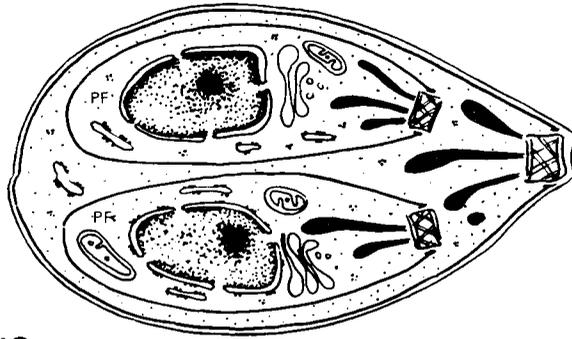
As imagens eletrônicas obtidas em *Besnoitia jellisoni*, *Sarcocystis tenella* e em *Frenkelia* mostram que a divisão por endodiogenia nestes proazoários é semelhante à descrita para o *Toxoplasma gondii* (43, 44, 45, 46, 47, 49).

ESQUIZOGONIA

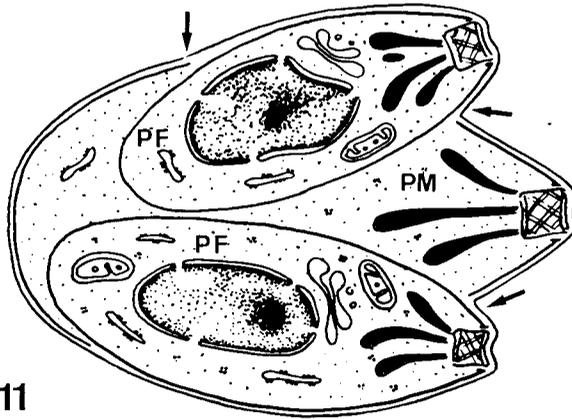
Vários autores têm relatado a existência do processo esquizogônico de divisão

para o *Toxoplasma* bem como para *Besnoitia jellisoni*. Pereira de Castro (35) observou em cultura de tecidos casos em que o núcleo do parasito se dividia de modo a formar até mais de 32 núcleos, sem que houvesse divisão do citoplasma, o que caracteriza um processo esquizogônico de divisão. Gavin *et al* (12) interpretaram as imagens de rosáceas, obtidas ao microscópio eletrônico, como sendo uma célula multinucleada e que se assemelhava àquelas encontradas em parasitos da malária. Todavia, as observações iniciais de Ogino e Yoneda (33), confirmadas e ampliadas por Sheffield e Melton (50), demonstram que na realidade tais imagens não correspondem a uma esquizogonia, mas são resultantes de endodiogenias repetidas. Isso ocorre nos casos em que os endozoitos formados estejam paralelos ao eixo longitudinal do "parasito mãe" de modo que os vários "parasitos filhos" formados permanecem ligados entre si pela região posterior. Caso os endozoitos cresçam em direções variadas, eles se distribuem aleatoriamente no vacúolo e nesse caso não há a formação de rosáceas típicas.

Esquizogonia é um processo de formação de células filhas por fissão múltipla. Se as células filhas forem merozoítas, o processo pode ser chamado de merogonia; se forem esporozoítas, esporogonia e se forem gametas, gametogonia (24). Como foi muito bem assinalado por Piekarski *et al* (37) todo o nosso conhecimento do processo de esquizogonia está baseado nos estudos clássicos realizados com o microscópio ótico. Os estudos mais recentes, feitos com o auxílio do microscópio eletrônico, têm fornecido maiores detalhes sobre este processo de divisão. Como exemplos clássicos de esquizogonia temos o que ocorre em parasitos da malária e em *Eimeria*. No entanto, comparando estes dois grupos, observam-se diferenças significativas no processo de formação dos merozoítos. Em ambos os casos o núcleo se divide sucessivamente sem que haja divisão do citoplasma. No entanto, a maneira de como se inicia a formação dos parasitos filhos é diferente, por exemplo, na *Eimeria callospermophili* o início é semelhante ao que ocorre no processo de endodiogenia, observado no *Toxoplasma*, isto é, acima do núcleo forma-se uma membrana espessa que se estende progressivamente, englo-



10



11

Figura 10 — Os dois parasitos filhos (P₁ e P₂) já completamente formados, no interior do "parasito mãe".

Figura 11 — Esquema que mostra a liberação dos parasitos filhos. A medida que se projetam para fora, recebem a membrana externa (M_e) a partir da membrana externa do "parasito mãe" (→)

bando partes do citoplasma do esquizonte, dando início à individualização do merozoito (38). O que temos observado na esquizogonia encontrada nas formas exoeritrocitárias do *Plasmodium juxtannucleare* (2) é diferente. Neste parasito forma-se uma membrana espessa, logo abaixo da membrana do esquizonte, e que se aprofunda no citoplasma do esquizonte incorporando núcleo e material citoplasmático, de modo a formar os merozoítas. No caso da *Eimeria bovis* (48), junto com a membrana espessa também aparece o conóide. Vale ressaltar que o *Plasmodium juxtannucleare*, bem como todas as espécies de parasitos da malária, não apresenta um conóide típico.

Acreditamos que as imagens observadas nas formas proliferativas do *Toxoplasma* com o microscópio ótico e interpretadas como esquizogonia, representam rosáceas formadas por endodiogonias sucessivas em que os parasitos formados permanecem ligados entre si pela região posterior. Realmente tal aspecto poderia, à microscopia ótica, fazer supor que se trate de uma esquizogonia.

Gavian *et al* (12) bem como Sheffield e Melton (50) sugerem que a endodiogenia pode ser considerada como uma forma especial de esquizogonia. Realmente estes processos de divisão, ainda que diferindo quanto ao número de parasitos que se formam, apresentam algumas semelhanças, principalmente no caso da esquizogonia que ocorre em *Eimeria callospermophili*. Em trabalho recente com *Eimeria tenella* e *Eimeria stiedae*, Scholtyssek (42) considera a esquizogonia como um processo que apresenta duas diferentes fases. Na primeira fase ocorre divisão sucessiva do núcleo e depois aparecem fissuras que subdividem o esquizonte em compartimentos uninucleados, não inteiramente livres, chamados de citômeros. Na segunda fase, ocorrerá em cada citômero uma divisão por endodiogenia. Somente com este último processo de divisão é que haveria formação dos merozoítas. Baseado neste fato ele propôs a hipótese de que a endodiogenia é o processo primário e fundamental de reprodução assexuada nos coccídeos e possivelmente em todos os esporozoários. A esquizogonia seria um processo secundário de reprodução que se desenvolveu posteriormente.

DIVISÃO NO INTESTINO DO GATO

Já no caso das formas intestinais encontradas no ciclo gametogônico do *Toxoplasma*, no gato, Hutchinson *et al* (20) bem como Frenkel *et al* (10) e outros autores, demonstraram a presença de um processo esquizogônico de divisão. Em estudo ao microscópio eletrônico, Sheffield (51) confirmou estes resultados e observou que o esquizonte se desenvolve dentro de um vacúolo no interior da célula epitelial do intestino do gato. É envolvido por duas membranas, uma externa e uma interna. Não foi observada a presença de microtúbulos subpeliculares. No citoplasma encontram-se ribossomos livres, mitocôndrias com cristas tubulares e abundante retículo endoplasmático. Também se encontra uma região especializada, onde está situado o conóide. Após duas ou mais divisões nucleares, começam a se formar os merozoítas de maneira semelhante ao que ocorre na endodiogenia. Forma-se a membrana espessa que progride englobando núcleo e porções do citoplasma. Estudo semelhante foi realizado por Piekarski *et al* (37) que no entanto, denominou este processo de divisão, de endopoligenia.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao final desta revisão, chegamos à conclusão de que pouco sabemos sobre a biologia do *Toxoplasma gondii*. Este protozoário dispõe de todas as organelas necessárias para uma existência independente bem como as enzimas da via glicolítica, do ciclo de Krebs e do sistema de citocromos. É capaz de sintetizar os diferentes tipos de RNA sem necessidade de estar no interior de uma célula. Apresenta um DNA quantitativamente semelhante ao encontrado entre os tripanosomídeos ou seja, cerca de $1,0 \pm 0,2 \times 10^{-13}$ gramas por parasito, concentração esta que é cerca de 50 vezes menor que a encontrada em uma célula hepática. Aparentemente o *Toxoplasma* não depende do citoplasma de uma célula hospedeira para sintetizar o seu DNA (36). No entanto, mesmo com todos estes dados, obtidos recentemente com a aplicação das técnicas de biologia molecular, continuamos sem ter uma hipótese satisfatória que explique a dependência celular deste parasito.

Muito resta para ser esclarecido, quanto ao processo de divisão. Por exemplo, pouco sabemos sobre o processo de formação do conóide. Deve haver algum mecanismo que regule a sua formação. Resultados obtidos por Hammond and Danforth (18) em *Eimeria magna*, nos esquizontes de segunda geração em cultura de tecidos, mostraram um exemplo de "erro" na formação do complexo apical que consistiu na formação em excesso dessas estruturas, que permaneceram sem serem aproveitadas, no corpo residual do esquizonte.

Achamos que a microscopia eletrônica, associada às modernas técnicas citoquímicas e imunocitoquímicas, que permitem a visualização de enzimas, antígenos e anticorpos ao nível ultraestrutural, muito poderá ajudar no esclarecimento de aspectos biológicos do *Toxoplasma* e na fisiopatogenia da toxoplasmose. Por outro lado torna-se necessário intensificar estudos bioquímicos sobre o parasito que, correlacionados com os dados morfológicos, poderão

futuramente servir de base para o encontro de substâncias específicas com fins terapêuticos.

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Hertha Meyer, Marysa de Oliveira Musacchio, Raul Dodsworth Machado e Gerson Cotta Pereira pela contribuição prestada durante a preparação deste trabalho. Ao Sr. Aderbal Alexandre Alves e a Sra. Nina Neal Shannon-Montgomery pelos auxílios técnicos e a Srta. Maria Helena Barbosa da Silva de Sá pelo trabalho de datilografia.

Ao Conselho de Ensino e Pesquisa da U.F.R.J., Conselho de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Fundação Gulbenkian e Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico (BNDE — Contrato FUNTEC 143) pelos auxílios concedidos aos Laboratórios de Cultura de Tecidos e Microscopia Eletrônica do Instituto de Biofísica da U.F.R.J.

SUMMARY

In this paper a general review is given on some biological aspects of Toxoplasma gondii, especially on the ultrastructure of the interphasic form and the modifications which occur in the ultrastructure during the division of the parasite.

Initially the process of binary division has been discussed, admitting, however, that the images which have been considered as binary division might represent stages of the division by endodiogeny.

The modifications are then described which occur in the fine structure of the "mother parasite" during the process of endodiogeny, i.e. the formation of the 2 "daughter parasites" in its interior. This process is the same in Toxoplasma gondii, Besnoitia jellisoni, Sarcocystis tenella and Frenkelia.

The possibility is then discussed that "daughter parasites" are formed by the process of schizogony, as had been suggested by various authors. More recent results however show that schizogony does not exist in the vegetative forms of Toxoplasma gondii and that the images which were considered as such under the light microscope are the result of successive endodiogenies during which the newly formed endozoites remain united at their posterior region. Real schizogony, however, is found in the forms which develop in the interior of the epithelial cells in the intestine of the cat, which is considered the final host of Toxoplasma gondii.

The concept of schizogony is then discussed, comparing this process in 3 different parasites as Eimeria bovis, Eimeria calospermophili and Plasmodium juxtannulare which show certain differences in the initial phases of the individualization of the new parasites. The author then discusses the hypothesis which considers the endodiogeny the fundamental process of the division in Sporozoa, occurring at the final phase of schizogony.

Finally, attention is given to the role which electron microscopy together with modern techniques of cytochemistry and immunocytochemistry might play to reach a better understanding of the biology of *Toxoplasma gondii* and the physiopathology of toxoplasmosis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIKAWA, M., HUFF, C. G. & SPRINZ, H. — Fine structure of the asexual stages of *Plasmodium elongatum*. *J. Cell Biol.* 34: 227-250, 1967.
2. DE OLIVEIRA MUSACCHIO, M. DE SOUZA, W. — *Plasmodium juxtancleare*: An electron microscopic study of the exoerythrocytic stages. "in press".
3. DE SOUZA, W. — Sobre o cultivo de alguns protozoários de vida intracelular em cultura de tecidos. *A Folha Médica* 64: 503-510, 1972.
4. DE SOUZA, W. — Mise en évidence et structure du système microtubulaire de *Toxoplasma gondii*. *C. R. Acad. Sc. Paris* 275: 2899-2901, 1972.
5. DE SOUZA, W. — Fine structure of the conoid of *Toxoplasma gondii*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. "in press".
6. DE SOUZA, W. & MEYER, H. — On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue forms, Spindle fiber in the dividing nucleus. *J. Protozool.* "in press".
7. DUBREMETZ, J. F. — L'ultrastructure du centriole et du centrosome chez la coccidie *Eimeria necatrix*. Étude au cours de la schizogonie. *Journal de Microscopie* 12: 453-458, 1971.
8. DUBREMETZ, J. F. — Etude ultrastructurale de la mitose schizogonique chez la coccidie *Eimeria necatrix* (Johnson, 1930). *J. Ultrastruct. Res.* 42: 354-376, 1973.
9. FAYFR, R., HAMMOND, D. M., CHOBOTAR, B. & ELSNER, Y. Y. — Cultivation of *Besnoitia jellisoni* in bovine cell culture. *J. Parasit.* 55: 645-653, 1969.
10. FRENKEL, J. K., DUBEY J. P. & MILLER, N. L. — *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts *Science* 167: 893-896, 1970.
11. GARNHAM, P. C. C., BAKER, J. R. & BIRD, R. G. — Fine structure of the cystic form of *Toxoplasma gondii*. *Brit. Med. J.* 5271: 83-84, 1962.
12. GAVIN, M. A., WANKO, T. & JACOBS, L. — Electron microscope studies on reproducing and interkinetic *Toxoplasma*. *J. Protozool.* 9: 222-234, 1962.
13. GOLDMAN, M., CARVER, R. K. & SULZER, A. J. — Similar internal morphology of *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni* stained with silver protein. *J. Parasit.* 43: 490-491, 1957.
14. GOLDMAN, M., CARVER, R. K. & SULZER, A. J. — Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. *J. Parasit.* 44: 161-171, 1958.
15. GUIMARÃES, F. N. & MEYER, H. — Cultivo de *Toxoplasma* (Nicolle et Manceaux, 1909) em cultura de tecido. *Rev. Bras. Biol.* 123: 126, 1942.
16. GUSTAFSON, P. V., AGAR, H. D. & GRAMER, D. S. — An electron microscope study of *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 3: 1008-1021, 1954.
17. HAMMOND, D. M., ROBERTS, W. L., YOUSSET, N. N. & DANFORTH, H. D. — Fine structure of the intranuclear spindle poles in *Eimeria callospermophili* and *Eimeria magna*. *J. Parasit.* 59: 581-584, 1973.
18. HAMMOND, D. M. & DANFORTH, H. D. — Abnormal development of conoids in *Eimeria magna*. *J. Parasit.* 59: 585-587, 1973.
19. HOWELLS, R. E. & DAVIES, E. E. — Nuclear division in the oocyst of *Plasmodium berghei*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 65: 451-459, 1971.
20. HUTCHINSON, W. M., DUNACHIE, J. F., CHR — SIIM, J. & YORK, K. — Coccidian like nature of *Toxoplasma gondii*. *Brit. Med. J.* 1: 142-144, 1970.
21. JADIN, J. M., CREEMERS, J. & GIROUD, P. — Les stades initiaux du mode de division binaire de *Toxoplasma gondii*. *Nicolle et Manceaux, 1909. C. R. Acad. Sc. Paris.* 268: 103-194, 1969.

22. JONES, T C., YEH, S. & HIRSCH, J. G. — The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I — Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J. Exp. Med.* 136: 1157-1172, 1972.
23. LEVADITI, C., SANCHIS-BAYARRI, V., LÉPINE, P. & SHOEN, R. — Étude sur l'encephalo-myélite provoquée par le *Toxoplasma cuniculi*. II — Essais de culture des Toxoplasmes en présence de tissus in vitro. *Ann. Inst. Pasteur.* 43: 80-86, 1969.
24. LEVINÉ, N. D. — Uniform terminology for the protozoan sub-phylum apicomplexa. *J. Protozool.* 18: 352-355, 1971.
25. LYCKE, E., LUND, E. & STRAMNENGARD, O. — Enhancement by lysosyme and hyaluronidase of the penetration by *Toxoplasma gondii* into cultured host cells. *Brit. J. Exp. Path.* 46: 189-199, 1965.
26. MEYER, H. & XAVIER DE OLIVEIRA, M. — Resultados de 3 anos de observação de cultivo de *Toxoplasma* (Nicolle et Manceaux, 1909) em cultura de tecido. *Rev. Bras. Biol.* 5: 145-148, 1945.
27. MEYER, H. & DE ANDRADE MENDONÇA, I. — Electron microscopic observation of *Toxoplasma* "Nicolle et Manceaux" grown in tissue cultures. *Parasitology.* 45: 449-451, 1955.
28. MEYER, H. & DE ANDRADE MENDONÇA, I. — Electron microscopic observations of *Toxoplasma* "Nicolle et Manceaux" in thin sections of tissue cultures. *Parasitology.* 47: 66-69, 1957.
29. MEYER, H. & DE OLIVEIRA MUSACCHIO, M. — Electron microscope study of the exoerythrocytic form of *Plasmodium gallinaceum* in thin sections of infected tissue cultures. *J. Protozool.* 7: 222-228, 1960.
30. MEYER, H. & DE OLIVEIRA MUSACCHIO, M. — An electron microscopic study of the final and initial forms of *Plasmodium gallinaceum* in thin sections of infected tissue cultures. *J. Protozool.* 12: 193-202, 1965.
31. MEYER, H. & DE SOUZA, W. — Estudo ultra-microscópico do *Toxoplasma gondii* em culturas de tecidos. *An. Acad. Bras. Ci.* 44: 584-585, 1972.
32. MEYER, H. & DE OLIVEIRA MUSACCHIO, M. — *Toxoplasma gondii* in tissue cultures. A microcinematographic study in phase contrast. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* "in press".
33. OGINO, N. & YONEDA, C. — The fine structure and mode of division of *Toxoplasma gondii*. *Arch. Ophthalmol.* 75: 218-227, 1966.
34. OLISA, E. E. G. — The fine structure of reproducing, *Toxoplasma gondii*. *Parasitology.* 53: 643-649, 1963.
35. PEREIRA DE CASTRO, M. — Divisão múltipla de *Toxoplasma* em cultura de tecidos. *Arq. Inst. Biol.* 22: 233-240, 1955.
36. FERROTO, J., KEISTER, D. B. & GELDERMAN, A. H. — Incorporation of precursors into *Toxoplasma* DNA. *J. Protozool.* 18: 470-473, 1971.
37. PIKARSKI, G., PELSTER, B. & WITTE, H. M. — Endopolygenie bei *Toxoplasma gondii*. *Z. Parasitenk.* 36: 122-130, 1971.
38. ROBERTS, W. L., HAMMOND, D. M., ANDERSON, L. C. & SPEER, C. A. — Ultrastructural study of Schizogony in *Eimeria callospermophili*. *J. Protozool.* 17: 584-592, 1970.
39. RUDZINSKA, M. A., TRAGER, W. & BRAY, R. S. — Pinocytotic uptake and the digestion of hemoglobin in malarial parasites. *J. Protozool.* 12: 563-576, 1965.
40. SABIN, A. B. & OLITSKY, P. K. — *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. *Science.* 85: 336-338, 1937.
41. SCHOLTYSECK, E. & MELHORN, H. — Ultrastructural study of characteristic organelles (Paired organelles, Micronemes, Micropores) of sporozoa and related organisms. *Z. Parasitenk.* 34: 97-127, 1970.
42. SCHOLTYSECK, E. — Die deutung von Endodyogenie und schizogonie bei Coccidien und anderen sporozoen. *Z. Parasitenk.* 42: 87-104, 1973.
43. SCHOLTYSEK E., MELHORN, H. & MÜLLER, E. G. — Identifikation von Merozoiten der vier cystenbildenden Coccidien (*Sarcocytis*, *Toxoplasma*, *Besnoitia*, *Frenkelia*) auf grund feinstruktureller kriterien. *Z. Parasitenk.* 42: 185-206, 1973.
44. SÉNAUD, J. — Les modalités de la multiplication des éléments cellulaires dans le kystes de la sarcopodidie du mouton (*Sarcocytis tenella* Railliet, 1886). *C. R. Acad. Sc. Paris.* 256: 1009-1011, 1963
45. SÉNAUD, J. — Contribution à l'étude des Sarcosporidies et des Toxoplasmes (*Toxoplasma*). *Protistologica.* 3: 167-232, 1967.

46. SÉNAUD, J. — Sur l'ultrastructure des kystes de *Besnoitia jellisoni* — Frenkel 1953 — (sporozoa, Toxoplasma) chez le souris (*Mus musculus*). C. R. Sc. Paris, 268: 816-819, 1969.
47. SHEFFIELD, H. G. — Electron microscopic study, of the proliferate form of *Besnoitia jellisoni*. J. Parasit. 52: 583-594, 1966.
48. SHEFFIELD, H. G. & HAMMOND, D. M. — Electron microscope observations on the development of first generation merozoites of *Eimeria bovis*. J. Parasit. 53: 831-840, 1967.
49. SHEFFIELD, H. G. — Observations on the fine structure of the "cyst stage" of *Besnoitia jellisoni*. J. Protozool, 15: 685-693, 1968.
50. SHEFFIELD, H. G. & MELTON, M. L. — The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. J. Parasit. 54: 209-226, 1968.
51. SHEFFIELD, H. G. — Schizogony in *Toxoplasma gondii*. An electron microscope study. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 37: 237-242, 1970.
52. VIVIER, E. & PETITPREZ, A. — Le complexe membranaire superficiel et son evolution lors de l'elaboration des individus fils chez *Toxoplasma gondii*. J. Cell Biol. 43: 329-342, 1968.
53. VIVIER, E. — Observations nouvelles sur la reproduction asexuée de *Toxoplasma gondii* et considérations sur la notion d'endogenèse. C. R. Acad. Sc. Paris, 271: 2123-2126, 1970.
54. VIVIER, E. — Variabilité des processus de reproduction vegetative de *Toxoplasma gondii* chez la souris. Comptes Rendus 1er Multicolloque Europeen de Parasitologie. Rennes, I au 4 septembre, 1971.
55. VIVIER, E. & PETITPREZ, A. — Données ultrastructurales complémentaires, morphologiques et cytochimiques, sur *Toxoplasma gondii*. Protistologica. 8: 199-221, 1972.
56. ZYPEN, E. VAN DER & PIEKARSKI, G. — Die endodyogenie bei *Toxoplasma gondii*. Eine morphologische Analyse. Z. Parasitenk. 29: 15-36, 1967.