

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA GERAL**

**AVALIAÇÃO DA INFECCÃO EXPERIMENTAL DE NEURÔNIOS E DE CÉLULAS  
DA GLIA DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR POR UMA CEPA BRASILEIRA  
ATÍPICA DE *Toxoplasma gondii***

**Joana Lobato Barbosa**

**BELO HORIZONTE**

**2015**

**JOANA LOBATO BARBOSA**

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE NEURÔNIOS E CÉLULAS DA  
GLIA DO GÂNGLIO CERVICAL SUPERIOR POR UMA CEPA BRASILEIRA  
ATÍPICA DE *Toxoplasma gondii***

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Patologia Geral da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Mestre em Patologia área de concentração em  
Patologia Investigativa.**

**Orientador:** Prof. Rosa Maria Esteves Arantes

**Co-orientador:** Ricardo Wagner de Almeida Vitor

**Belo Horizonte/MG**

**2015**

Barbosa, Joana Lobato.

Avaliação da infecção experimental de neurônios e células da glia do gânglio cervical superior por uma cepa brasileira atípica de toxoplasma gondii [manuscrito] / Joana Lobato Barbosa. - 2015.

111 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Rosa Maria Esteves Arantes. Co-orientador: Ricardo Wagner de Almeida Vitor.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais.

1. Toxoplasma gondii - Teses. 2. Neurônios - Teses. 3. Células - Cultura e meios de cultura - Teses. 4. Gânglio cervical superior. 5. Imunofluorescência - Teses. 6. Nova cepa. 6. Patologia - Teses. I. Arantes, Rosa Maria Esteves. II. Vitor, Ricardo Wagner de Almeida. III. Universidade Federal de Minas Gerais. IV. Título.

CDU: 616

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, professora Dra. Rosa Maria Esteves Arantes, pela oportunidade, pela confiança depositada em mim, por toda a dedicação a este trabalho e por sempre me incentivar a buscar o conhecimento.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor e aos colegas do Laboratório de Toxoplasmose por todo o auxílio que foi essencial para a realização desse trabalho.

À professora Dra. Rossiane C. Vommaro da UFRJ/RJ e ao professor Dr. Louis M. Weiss da Albert Einstein College of Medicine por ceder o anticorpo BAG1.

Aos professores e colegas do Departamento de Patologia Geral, principalmente do LPL que sempre estiveram dispostos a ajudar.

Aos amigos do NIPE, foram muitos nesses dois anos, e cada um que passou pela minha vida nesse tempo deixou alegrias e aprendizados. Mais do que colegas, vocês são meu amigos. Nós dividimos festas, dúvidas, estresses, certezas e acima de tudo, muitas risadas e momentos felizes. Obrigada por sempre terem um sorriso no rosto, uma palavra amiga ou um ouvido para escutar. Sem vocês essa dissertação não teria saído.

Em especial gostaria de agradecer à Dra. Christiane Cartelle que auxiliou em muito nesse trabalho e nos meus conhecimentos. Muito do que aprendi, foi com ela. À Dra. Maria Noviello, com quem divido esse trabalho. Obrigada por me socorrer quando precisei, pelo seu carinho em todos os momentos e por mostra sempre como um gesto e uma palavra amiga mudam tudo.

Aos meus amigos que entraram na minha vida e ficaram. Nossos momentos de festa, descontração e cumplicidade fizeram esses anos, e principalmente esses últimos meses, mais leves.

À CAPES e às agências financiadoras CNPq e FAPEMIG, pela infra-estrutura do NIPE e pela bolsa de mestrado.

Principalmente quero agradecer ao meu irmão Vicente, que levo sempre comigo, e aos meus pais Cícero e Vânia, que viveram comigo noites em claro e fins de semana de trabalho. Obrigada pelo carinho, apoio, paciência e compreensão.

E a todos que de alguma forma me ajudaram – Muito obrigada!

"... pergunto coisa ao burií; e o que ele responde é: a coragem minha. Burií quer todo azul, e não se aparta de sua água - carece de espelho. Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende."

– Guimarães Rosa

## RESUMO

Aproximadamente dois bilhões de pessoas, em todo o mundo, estão infectadas cronicamente com o parasito *Toxoplasma gondii*, com amplas consequências. A infecção é extremamente bem sucedida. O parasito é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica e após o estabelecimento de uma resposta imune eficaz, estabelecer infecção crônica. A reativação da doença em indivíduos imunocomprometidos causa encefalite toxoplásmica que pode levar à morte. O tratamento para toxoplasmose é limitado e pode ser tóxico ao hospedeiro. No Brasil, o *T. gondii* possui uma estrutura genética populacional incomum, que tem sido correlacionada com as manifestações mais graves da doença. Nós utilizamos uma cepa virulenta, recém isolada e genotipada, obtida a partir do sangue um de recém-nascido diagnosticado com toxoplasmose congênita em Minas Gerais/Brasil. Para avaliação da infecção *in vitro* de neurônios e células da glia pela cepa virulenta TgCTBr9, nós utilizamos culturas primárias de neurônios e células da glia obtidos a partir da remoção do gânglio cervical superior de camundongos C57BL/6 com 1 a 2 dias de vida. As culturas foram infectadas a um MOI de 10 e acompanhadas por 24, 48, 72, 96 e 192 horas pós infecção e então fixadas e analisadas para danos neuronais, infectividade e marcadores estruturais e funcionais. Foram detectados parasitos em neurônios e células da glia em todos os tempos analisados, além do crescente aumento da taxa de infecção ao longo do tempo. Com 72 horas de infecção foi identificada a expressão de elementos da parede do cisto e esse processo estava completo com 192 horas. Nesse tempo nós também observamos a presença de bradizoítos. De 24 a 96 horas, as taxas de sobrevivência neuronal e da densidade neurítica não foram estatisticamente significantes em relação aos controles intraexperimentais. No entanto, evidências de danos neuronais foram qualitativamente observadas com 96 horas, quando a taxa de infecção é significativamente maior. Quanto à função neuronal e morfologia, foi observado que a  $\beta$ -tubulina é expressa ao redor de taquizoítos em neurônios infectados que também demonstram diminuição na intensidade da expressão de tirosina hidroxilase com o aumento do tempo de infecção. Nossos resultados demonstram de forma original que a cepa virulenta TgCTBr9 não só é capaz de infectar neurônios e células da glia *in vitro*, mas também de se diferenciar e encistar espontaneamente com 192 horas.

## ABSTRACT

Approximately two billion people are infected chronically with *Toxoplasma gondii* worldwide, showing unknown consequences. The infection is extremely successful. The parasite is able to cross the biological brain barrier inducing a chronic stage after the establishment of an immune response. The reactivation of the disease in immunocompromised patients causes toxoplasmic encephalitis that can lead to death. The toxoplasmosis treatment is limited and can be toxic for the host. In Brazil, *T. gondii* shows an uncommon genetic population structure, which have shown to correlate to more severe manifestations of the disease. We used a newly isolated and genotyped virulent strain obtained from the peripheral blood of human newborns diagnosed with congenital toxoplasmosis from 12 regions of Minas Gerais/ Brazil. In order to analyze the *in vitro* infection of neurons and glial cells by the virulent TgCTBr9 strain we used primary neuron and glial cell cultures, obtained by the removal of the superior cervical ganglia from 1 to 2 days C57BL/6 mice. The cultures were infected with a MOI of 10 and followed for 24, 48, 72, 96 and 192 hours post-infection and then fixed for analysis of neuronal damage, infection rate and immunofluorescence staining for structural and functional markers. We found the parasite in neurons and glial cells in all times analyzed, and the rate of infection in these cells increased with time. At 72 hours of infection we started to detect the expression of components of the cyst wall and this deposition was completed 192 hours post-infection. At this time we also found bradyzoites. From 24 to 96 hours, the neuronal survival rate and the neurite density of infected cultures were not significantly different from their intraexperimental controls. However, evidence for neuronal damage was qualitatively observed at 96 hours post-infection when infection rate was significantly increased. Regarding neuronal function and morphology, we have found that  $\beta$  tubulin is expressed around tachyzoites in infected neurons, which express progressive decrease in tyrosine hydroxylase staining intensity over time. Our data shows that the virulent TgCTBr9 strain is not only able to infect neurons and glial cells *in vitro*, but also undergoes spontaneous encystment 192hs post-infection. This was an unprecedented result since there are no studies correlating this unusual strain and the pathogenesis of Toxoplasmosis in Brazil.



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Anticorpos utilizados

página 36

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	página 17
Figura 2. Morfologia de taquizoítos e bradizoítos	página 19
Figura 3: Modelo da invasão de <i>Toxoplasma gondii</i> na célula hospedeira	página 24
Figura 4. Grade para determinação da densidade neurítica	página 38
Figura 5. Relação de neurônios e células da glia do gânglio cervical superior em culturas controle	página 40
Figura 6. Determinação da taxa de infecção das culturas primárias de neurônios e células da glia	página 41
Figura 7. Determinação do número de corpos neuronais das culturas primárias de neurônios e células da glia com relação à taxa de infecção	página 42
Figura 8. Determinação da densidade neurítica das culturas primárias de neurônios e células da glia com relação à taxa de infecção	página 43
Figura 9. Imagem de campo claro das culturas primárias controle e infectadas de neurônios e células da glia	página 46
Figura 10. Taxa de infecção de células da glia em culturas primárias de neurônios com células da glia	página 47
Figura 11. Taxa de infecção de neurônios nas culturas primárias de neurônios com células da glia	página 48
Figura 12. Coloração de Giemsa das culturas primárias de neurônios com células da glia infectadas	página 50
Figura 13. Coloração de PAS das culturas primárias de neurônios com células da glia infectadas	página 53
Figura 14. Taxa de diferenciação em células da glia de taquizoítos em bradizoítos nas culturas primárias.	página 54
Figura 15. Taxa de diferenciação em neurônios de taquizoítos em bradizoítos nas culturas primárias.	página 55
Figura 16. Número de corpos neuronais das culturas primárias de neurônios com glia	página 56
Figura 17. Número de corpos neuronais das culturas primárias de 24 e 96 horas	página 57
Figura 18. Densidade neurítica das culturas primárias de neurônios com glia	página 58
Figura 19. Imunomarcção de taquizoítos e do citoesqueleto de neurônios	página 61
Figura 20. Imunomarcção de bradizoítos	página 64
Figura 21. Imunomarcção da parede dos cistos	página 67
Figura 22. Imunomarcção para tirosina hidroxilase	página 70
Figura 23. Microscopia eletrônica de transmissão de células da glia	página 73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>Ara-C</b>	Arabinosídeo-C
<b>BAG</b>	<i>Bradyzoite specific BAG1 proteins</i>
<b>BSA</b>	Soro albumina bovina
<b>CAPES</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CDC</b>	Centro de controle e prevenção de doenças
<b>CEBIO</b>	Centro de bioterismo
<b>CETEA</b>	Comitê de ética em experimentação animal
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás carbônico
<b>CTL</b>	Células T citotóxicas
<b>DBA</b>	<i>Dolichos biflorus Agglutinin</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified eagle médium</i>
<b>ET</b>	Encefalite toxoplásmica
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FAPEMIG</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
<b>GCS</b>	Gânglio Cervical Superior
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar da glia
<b>HFF</b>	Fibroblasto do prepúcio humano
<b>H/H</b>	Solução de Hanks tamponada com solução Hepes
<b>hsp70</b>	<i>heat-shock protein 70</i>
<b>ICB</b>	Instituto de Ciências Biológicas
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>i.p.</b>	Intra peritoneal
<b>Lamp-1</b>	<i>Lysosomal-Associated Membrane Protein 1</i>
<b>LD<sub>100</sub></b>	100% dose letal
<b>LMD</b>	Migração a longas distâncias
<b>MIC</b>	Proteínas de micronemas

<b>MJ</b>	<i>Moving junction</i>
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MOI</b>	Multiplicidade de infecção
<b>MVP</b>	Membrana do vacúolo parasitóforo
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear κB
<b>NGF</b>	Fator de crescimento neuronal
<b>NIPE</b>	Neuro Imuno Patologia Experimental
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>p</b>	valor de probabilidade
<b>PAS</b>	Ácido periódico de Schiff
<b>PBS</b>	Solução Tampão Fosfato
<b>PGP 9.5</b>	Produto Protéico do Gene 9.5
<b>Rop</b>	Proteínas de róptrias
<b>SEM</b>	Erro padrão da média
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SIF</b>	Células Pequenas Intensamente Fluorescentes
<b>SNA</b>	Sistema nervoso autônomo
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SNP</b>	Sistema Nervoso Periférico
<b>TCD4+</b>	Linfócito TCD4
<b>TgCTBr</b>	<i>Toxoplasma gondii</i> congenital toxoplasmosis from Brazil
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilase
<b>Th1</b>	Células T helper tipo 1
<b>TNF-α</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>ToxoDB</b>	<i>Toxoplasma data base</i>
<b>VP</b>	Vacúolo parasitóforo
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μm</b>	Micrômetro
<b>°C</b>	Graus Célcus

## SUMÁRIO

FICHA CATALOGRAFICA .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
AGRADECIMENTOS .....	4
RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
LISTA DE QUADROS .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	11
SUMÁRIO .....	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Toxoplasmose.....	15
1.2. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	17
1.3. Morfologia de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	19
1.4. Estrutura genética de <i>T. gondii</i> e virulência .....	20
1.5. Rompimento da barreira hematoencefálica e invasão da célula hospedeira .....	22
1.6. Encistamento .....	25
1.7. Patogenia .....	26
1.8. Sistema nervoso.....	27
1.9. Toxoplasmose e o sistema nervoso.....	28
2. OBJETIVO GERAL.....	31
2. 1. Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Animais .....	32
3.2. Obtenção e manutenção da cepa.....	32
3.3. Eutanásia dos neonatos e retirada dos gânglios .....	32
3.4. Plaqueamento de células.....	33
3.5. Infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> in vitro.....	33
3.6. Fixação das culturas .....	34
3.7. Documentação fotográfica.....	34
3.8. Coloração.....	34
3.9. Imunofluorescência .....	35
3.10. Determinação da taxa de infecção .....	37
3.11. Determinação da taxa de diferenciação .....	37
3.12. Análise quantitativa da densidade neurítica.....	37
3.13. Análise quantitativa da sobrevida celular .....	38
3.14. Análise qualitativa das culturas .....	38
3.15. Análise estatística .....	39
4. RESULTADOS .....	40
4.1. Padronização das culturas.....	40
4.1.1. Proporção do número de células em cultura .....	40
4.1.2. Taxa de infecção de neurônios e células da glia .....	41
4.1.3. Análise da sobrevida neuronal.....	42
4.1.4. Análise da densidade neurítica .....	43
4.2. Cinética das alterações morfológicas em campo claro das culturas .....	44
4.3. Cinética da taxa de infecção em culturas.....	47
4.4. Cinética da taxa de diferenciação em bradizoítos.....	51
4.5. Cinética da sobrevida neuronal.....	56
4.6. Cinética da densidade neurítica .....	58
4.7. Avaliação da cinética da interação parasito/hospedeiro por imunomarcadores.....	59
4.7.1. Ocorre reorganização do citoesqueleto de neurônios .....	59
4.7.2. Com 24 horas observamos início da diferenciação espontânea de alguns taquizoítos em bradizoítos .....	62
4.7.3. Com 72 horas começamos a observar deposição de elementos da parede do cisto .....	65
4.7.4. Ocorre diminuição qualitativa da expressão de tirosina hidroxilase ao longo do tempo em culturas infectadas.....	68
4.8. Observação ultraestrutural do parasito em células da glia .....	71
5. DISCUSSÃO.....	74
7. CONCLUSÃO.....	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83
ANEXO I.....	88

ANEXO II.....	89
ANEXO III.....	90

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Toxoplasmose*

Assim como bactérias e vírus, muitos parasitos intracelulares obrigatórios são responsáveis por um significativo impacto negativo na saúde da população ao redor do mundo causando doenças debilitantes ou fatais. Entre esses parasitos, *Toxoplasma gondii* é um dos mais bem sucedidos no planeta, com distribuição global e afetando cerca de um terço da população mundial (Romano and Coppens 2013).

A toxoplasmose é considerada pela CDC (Centro de controle e prevenção de doenças) como uma das cinco doenças parasitárias negligenciadas além de ser uma das zoonoses mais comuns no mundo (<http://www.cdc.gov/parasites/npi/>). A prevalência de soro-positividade varia enormemente entre países, de acordo com localizações geográficas, aspectos climáticos, condições ambientais e hábitos culturais, sendo os hábitos alimentares e de higiene os elos fundamentais e de grande importância na epidemiologia da toxoplasmose humana (Contreras, Schenone et al. 1996; Ribeiro, Mutis et al. 2008).

No Brasil, a prevalência varia de 30 a 80%, dependendo da região do país e da classe sócio econômica da população analisada. A região noroeste do Rio Grande do Sul onde há predominância do agronegócio, principalmente no processamento de suínos, apresenta a maior ocorrência mundial de toxoplasmose ocular, com a prevalência de 17,7% na população rural do município de Erechim (Silveira, Belfort et al. 1988; Glasner, Silveira et al. 1992). Um estudo recente realizado com mais de 20 mil mulheres grávidas relatou 53% de prevalência (Vaz, Thomaz-Soccol et al. 2010), e no Recife, em estudo realizado com amostras de doadores de sangue, a prevalência chega a 75% (Coelho, Kobayashi et al. 2003). Na região metropolitana de São Paulo a soro prevalência encontrada foi cerca de 65% (Coelho, Kobayashi et al. 2003).

A infecção pode resultar em um quadro crônico caracterizado pela presença de cistos contendo bradizoítos no tecido muscular e no sistema nervoso central (Nath and Sinai 2003). Ela pode persistir ao longo da vida (Hill and Dubey 2002), tornando-se grave em casos como a toxoplasmose congênita e a encefalite toxoplásmica (ET). A infecção vertical, ou seja, da mãe para o feto, pode ocasionar: hidrocefalia, calcificação cerebral, retinocoroidite e aborto. A encefalite toxoplásmica acomete pacientes imunocomprometidos devido à reativação da

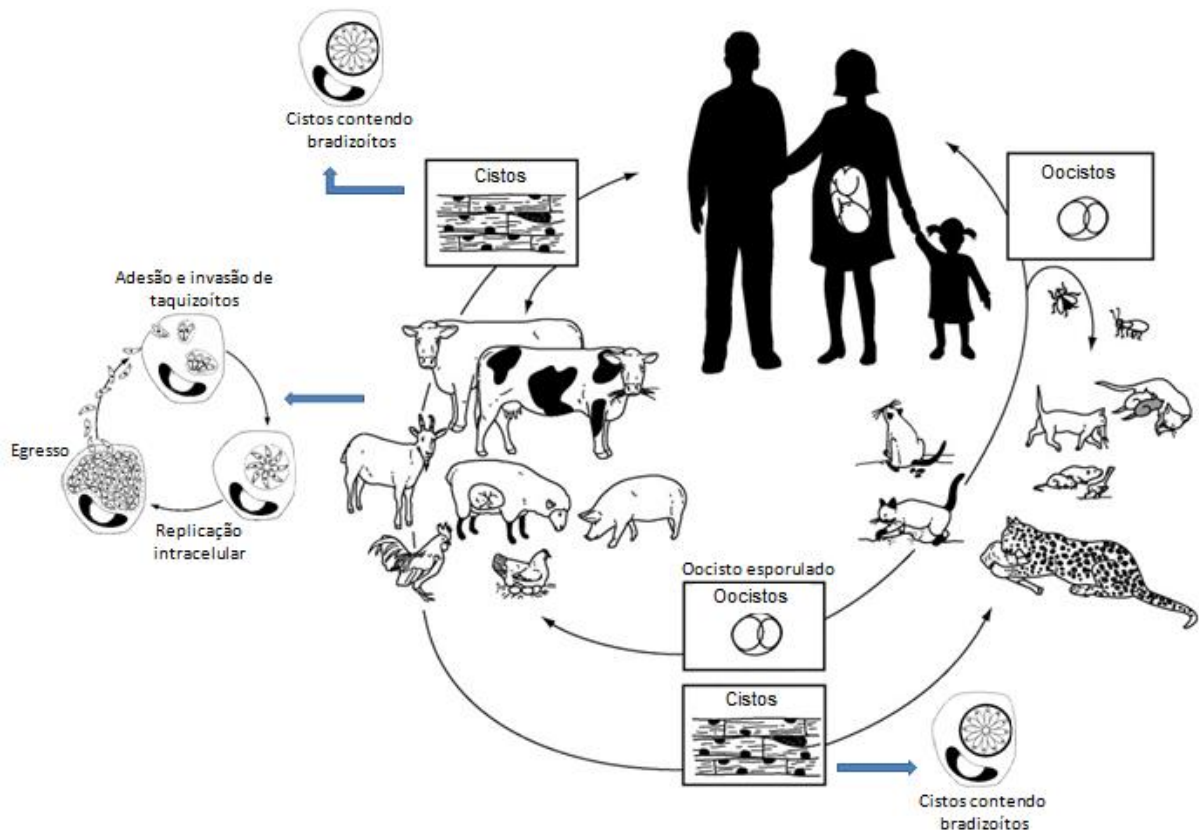
doença, podendo ser fatal. O tratamento da toxoplasmose é limitado e parcialmente eficaz, por não eliminar os cistos, e pode ser tóxico ao hospedeiro (Staessen, Gasowski et al. 1999).

Gilbert e colaboradores, em 2009 estudaram a toxoplasmose ocular em crianças infectadas congenitamente no Brasil. Eles concluíram que essa manifestação da doença no Brasil é mais grave que aquela encontrada em crianças da Europa. Essa conclusão foi baseada na comparação da lesão ocular em 30 crianças do Brasil, com 281 crianças da Europa usando metodologia similar. Nessas 30 crianças brasileiras, as lesões oculares eram mais extensas do que nas crianças europeias, e comumente encontradas na área da retina, afetando a visão central, mesmo em crianças que foram tratadas para toxoplasmose por 12 meses. Esse estudo concluiu que crianças brasileiras tem um risco cinco vezes maior de consequências severas da toxoplasmose, que crianças europeias. Algumas dessas diferenças podem estar relacionadas com as cepas, geneticamente atípicas, encontradas em humanos no Brasil (Gilbert 2009).

Atualmente não há estimativa do custo de tratar essas crianças infectadas com toxoplasmose no Brasil, mas o fardo financeiro nas famílias e no governo é alto, pois as consequências da doença são graves, o tratamento é longo e muitas vezes deletério para o paciente (Dubey, Lago et al. 2012). Além disso, a morbidade devido à toxoplasmose congênita no Brasil é muito maior que em outros países do mundo (Gilbert 2009). Em um estudo de Dubey e colaboradores, 2012, aproximadamente 35% das crianças acompanhadas nas últimas duas décadas, tinham doenças neurológicas, como hidrocefalia, microcefalia e retardo mental. Nesse mesmo estudo 80% das crianças tinham lesões oculares, e 40% tinham perda da audição (Dubey, Lago et al. 2012).



## 1.2. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*



**Figura 1: Ciclo do vida de *Toxoplasma gondii*.** Adaptado de Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant (6ª ed, 2006, capítulo 31)

O ciclo de vida do parasito é do tipo heteróxico facultativo sendo este capaz de infectar e de se multiplicar em virtualmente todas as células nucleadas de mamíferos e aves. O ciclo é dividido entre hospedeiros felinos (definitivo) e não felinos (intermediário) que representam a fase sexuada e assexuada do ciclo, respectivamente. A fase sexuada ocorre no epitélio intestinal de felídeos com a formação de macro e microgamontes que ao fecundarem dão origem a um oocisto que é liberado juntamente com as fezes do animal. Esse oocisto esporulado, que amadurece no meio ambiente, possui dois esporocistos com quatro esporozoítos. E apenas esses esporozoítos são infectantes (Black and Boothroyd 2000).

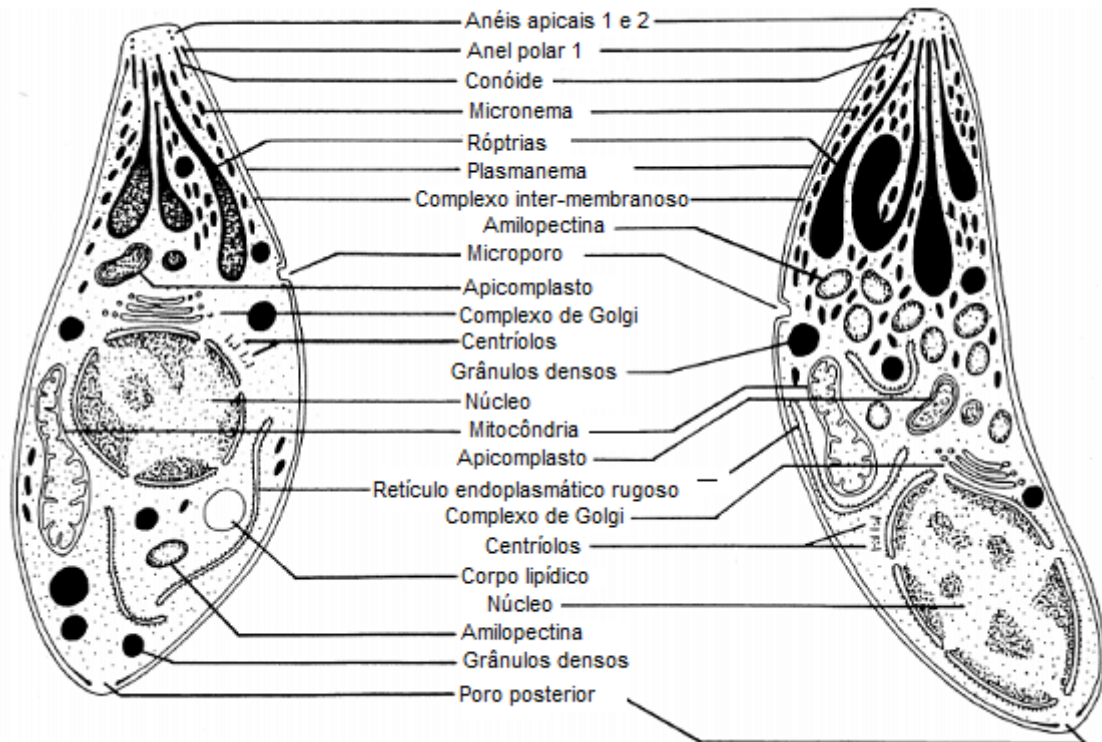
A fase assexuada tem início pela ingestão desses oocistos esporulados e maduros, através da ingestão de água ou alimentos mal lavados, e apresenta no hospedeiro intermediário uma fase aguda e uma crônica da infecção, cada uma com sua forma evolutiva característica (Dubey, Lindsay et al. 1998).

Após a ingestão de oocistos, estes se rompem no intestino e liberam esporozoítos que invadem o epitélio e se diferenciam em taquizoítos que são característicos da fase aguda da doença. Após passarem rapidamente pelo epitélio intestinal os taquizoítos ganham a corrente sanguínea e se espalham por todo o corpo. Essa forma é caracterizada pela replicação rápida com consequente lise das células infectadas, persistindo até o estabelecimento de uma resposta Th1 eficaz que leva à diferenciação de taquizoítos em bradizoítos (Dubey, Lindsay et al. 1998; Black and Boothroyd 2000).

Os bradizoítos são as formas presentes dentro de cistos teciduais e possuem replicação lenta. Eles são encontrados principalmente no tecido nervoso e muscular e podem permanecer relativamente inertes durante toda a vida do hospedeiro, com ocasionais reagudizações que podem levar a consequências graves para o hospedeiro (Black and Boothroyd 2000).

As formas mais comuns de infecção, além da ingestão de oocistos, são representadas pela ingestão de cistos presentes nos tecidos de animais que estão infectados na fase crônica da doença, e na infecção transplacentária ou congênita, em que ocorre transmissão de taquizoítos da gestante para o feto gerando consequências graves para o mesmo, incluindo hidrocefalia, cegueira, retardo mental, calcificações cerebrais e morte. Formas menos comuns de adquirir a infecção consistem na realização de transplantes, transfusões e em acidentes laboratoriais (Carruthers and Suzuki 2007).

### 1.3. Morfologia de *Toxoplasma gondii*



**Figura 2: Morfologia de taquizoítos e bradizoítos.** Desenho esquemático de um taquizoíto (esquerda) e de um bradizoíto (direita) baseados em imagens de microscopia eletrônica. Adaptado de Dubey, Lindsay et al. 1998.

*Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório, cujo nome do gênero é derivado do grego *toxon* (arco) e *plasma* (molde) devido ao seu formato encurvado e crescente. Pertence ao filo Apicomplexa, que inclui diversos patógenos de importância médica, dentre eles, *Plasmodium spp*, agente causador da malária. O filo é caracterizado pela presença do complexo apical, composto de organelas secretórias especializadas, como róptrias e micronemas, e de elementos do citoesqueleto, como os anéis polares e o conóide, este último apenas nos coccídeos, subclasse que inclui *T. gondii* (de Souza 1974; Morrissette and Sibley 2002).

O taquizoíto de *T. gondii* é uma célula polarizada, de forma alongada, apresentando a região anterior afilada e a região posterior arredondada. Mede aproximadamente 6µm de comprimento por 2µm de largura. Na região anterior ou apical estão localizados os anéis polares, o conóide, as róptrias e os micronemas, estruturas que formam o complexo apical. O núcleo situa-se na região mediana e acima deste dispõem-se o complexo de Golgi e o apicomplasto e uma vez na célula hospedeira, se localiza dentro do vacúolo parasitóforo (De Souza, et al. 2010).

Os bradizoítos são mais finos, medindo aproximadamente 7 $\mu$ m por 1,5 $\mu$ m e possuem núcleo localizado posteriormente. O conteúdo das róprias é mais eletrodense e essa forma do parasito também apresenta um número significativamente maior de micronemas e grânulos de amilopectina que os taquizoítos (Dubey, Suresh et al. 1998).

Os cistos são arredondados e irregulares e contém bradizoítos, e seu tamanho depende da idade do cisto e do tipo de célula parasitada. Cistos novos podem conter somente dois bradizoítos, e cistos maduros, centenas. A parede do cisto possui poros para a passagem de nutrientes, tem cerca de 0,5 $\mu$ m de diâmetro e se forma sob a membrana do vacúolo parasitóforo. A parede do cisto apresenta muitas invaginações, é glicosilada e se cora pela lectina *Dolichos biflorus* (DBA) (Halonen, Weiss et al. 1998; Lemgruber, Lupetti et al. 2011; Tomita, Bzik et al. 2013).

#### **1.4. Estrutura genética de *T. gondii* e virulência**

Em 1995, Howe e Sibley analisaram seis loci de 106 amostras recolhidas de animais e humanos e encontraram três estruturas populacionais clonais e as denominaram de tipos I, II e III, diferenciadas pelo seu genótipo e virulência. Mais tarde foi descoberto que a estrutura populacional está relacionada com as diferentes regiões geográficas, sendo as populações clonais presentes na América do Norte e Europa e as populações ditas recombinantes, presentes na África e América do Sul. Também foi observado que na América do Sul, as consequências mais graves da doença, como a ocorrência de toxoplasmose ocular, são mais comuns (Su, Shwab et al. 2010).

Essas populações recombinantes são originadas na fase sexuada do ciclo de vida e para tanto é necessário que o felino se infecte simultaneamente com mais de um tipo de cepa (Saeij, Boyle et al. 2005; Su, Shwab et al. 2010).

Os estudos sobre virulência em *T. gondii* são realizados em camundongos BALB/c pela determinação da concentração de taquizoítos necessária para causar a morte de todos os camundongos do grupo, sendo as letais (tipo I) aquelas que com a inoculação de apenas um taquizoíto leva à morte do animal. Em camundongos, cepas do tipo I, como a RH, são letais ( $LD_{100}=1$ ) e as cepas do tipo II (ME49) e III (VEG) são significativamente menos virulentas e desencadeiam um quadro crônico na infecção (Sibley and Boothroyd 1992). Em humanos,

essas manifestações variam enormemente, indo de infecções assintomáticas à toxoplasmose aguda severa, principalmente quando relacionadas a cepas atípicas (Bossi and Bricaire 2004). Boothroyd e Grigg, 2002, indicaram que as manifestações da toxoplasmose em camundongos podem ser comparadas com a manifestação da infecção em outros hospedeiros, pois os parasitos da cepa tipo I se reproduzem em células HFF (fibroblastos humanos do prepúcio) três vezes mais rápido que parasitos dos tipos II e III (Boothroyd and Grigg 2002). Além disso, a toxoplasmose ocular severa, comum em infecções com cepas tipo I, representa uma das manifestações que fortemente suportam a hipótese de que diferentes cepas estão associadas com diferentes manifestações clínicas (Boothroyd and Grigg 2002).

A toxoplasmose ocular é uma consequência frequente da infecção congênita e está relacionada à cepa tipo I (Holland 1999; Roberts and McLeod 1999). Essa infecção pode permanecer dormente por anos, eventualmente emergindo em outras fases da vida podendo causar retinocoroidite grave e também podendo causar reagudização em adultos (Boothroyd and Grigg 2002). Assim, de acordo com Boothroyd e colaboradores, 2002, a virulência extrema da cepa I em camundongos, pode de fato refletir alguma propriedade intrínseca que se manifesta como maior virulência também em humanos, pelo menos em relação à toxoplasmose ocular (Boothroyd and Grigg 2002).

A capacidade de atravessar barreiras biológicas, como a barreira hematoencefálica e a placenta são importantes para o sucesso da infecção, sendo assim, a capacidade de deslocamento do parasito também é um fator importante na virulência (Saeij, Boyle et al. 2005). Barragan e colaboradores, 2002, demonstraram que uma subpopulação de cepa do tipo I tem maior capacidade de migração (LDM) *in vitro*, quando comparado com as cepas tipo II e III e isso coincide com o fator de virulência (Barragan and Sibley 2002).

Análises genéticas confirmam a associação da capacidade migratória com a virulência através da análise de progenes recombinantes dos tipos I e III que demonstram que o fenótipo LDM está presente no cromossomo VIIa, o mesmo cromossomo previamente relacionado com a virulência do parasito (Barragan and Sibley 2003).

Além da correlação da virulência das diferentes cepas com a migração e a apresentação da doença, ainda podemos relacionar a taxa de multiplicação das cepas com a virulência. A taxa de parasitismo devido à rápida multiplicação está diretamente relacionada às consequências

da doença em camundongos, uma vez que altas taxas levam a uma superestimulação do sistema imune induzindo a produção de uma forte resposta do tipo Th1 com produção de citocinas e danos celulares (Suzuki 2002; Saeij, Boyle et al. 2005).

Sabe-se que no Brasil as cepas circulantes têm genótipo atípico, genótipo recombinante e comportamento semelhante a um dos tipos clonais, e que as consequências graves da toxoplasmose são mais comuns (Gilbert 2009). A partir desses dados e tendo em vista a grande prevalência de toxoplasmose congênita no Brasil e em Minas Gerais, Carneiro e colaboradores, 2013, isolaram e genotiparam 27 cepas de *Toxoplasma gondii* provenientes de recém-nascidos diagnosticados com toxoplasmose congênita em doze mesorregiões de Minas Gerais. Essas cepas foram denominadas TgCTBr1 a 27 e se encontram no ToxoDB ([www.toxodb.org](http://www.toxodb.org)). Elas apresentaram diferentes genótipos e virulências em camundongos (Carneiro, Andrade et al. 2013).

A cepa TgCTBr9, escolhida para este trabalho, foi caracterizada como virulenta em camundongos e foi isolada de um recém nascido com lesões oculares, calcificações cerebrais e que morreu poucos meses após o nascimento (Carneiro, Andrade et al. 2013).

### **1.5. Rompimento da barreira hematoencefálica e invasão da célula hospedeira**

A capacidade de atravessar rapidamente barreiras epiteliais e atingir a corrente sanguínea em poucas horas pós-infecção pode ser um importante componente de disseminação *in vivo*, especialmente em locais imunoprivilegiados como o sistema nervoso central (SNC) e a placenta com o feto em desenvolvimento. Após a infecção por via oral é possível que a capacidade de migração para tecidos profundos seja regulada positivamente, por exemplo, por seleção de parasitos capazes de cruzar o epitélio intestinal. Essa rápida migração parasitária provavelmente é crucial para a disseminação da infecção antes do aparecimento de uma resposta imune eficaz (Barragan and Sibley 2003).

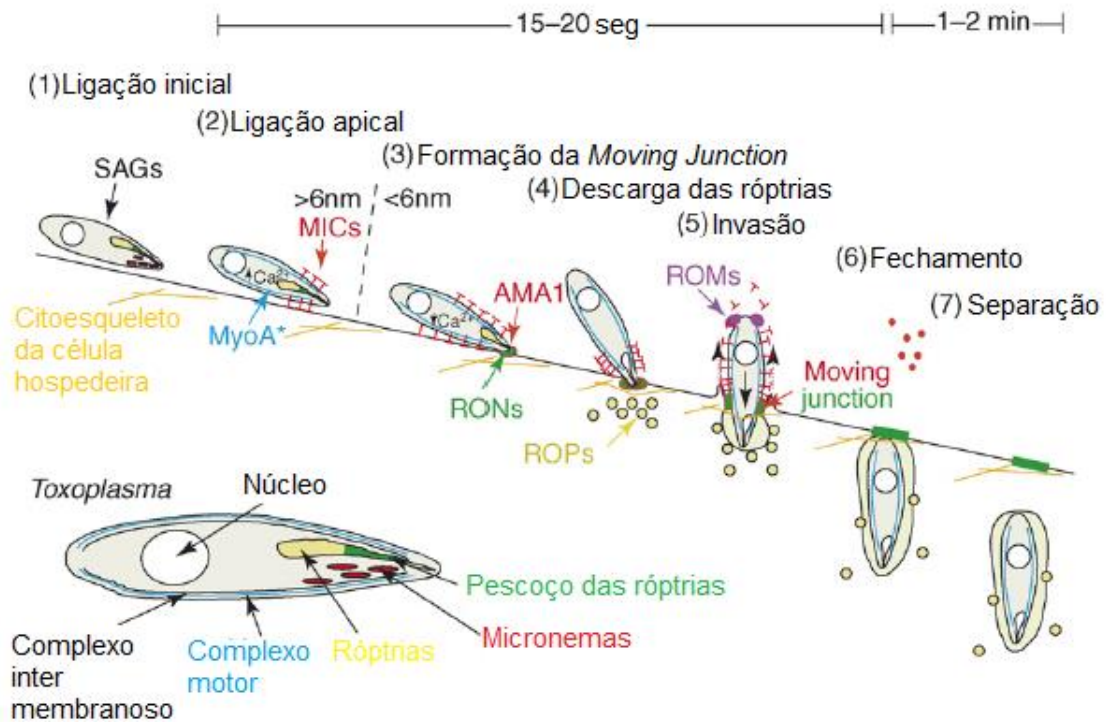
A disseminação do parasito e a consequente invasão de praticamente todas as células nucleadas do hospedeiro por taquizoítos é um processo ativo que requer a mobilidade e a liberação controlada de proteínas e lipídeos das organelas do complexo apical do parasito, uma vez que ele não apresenta apêndices locomotores como cílios, flagelos ou a emissão de pseudópodos. O parasito entra na célula hospedeira inicialmente pela adesão da sua parte

apical na membrana da célula hospedeira e em sequência, secreta proteínas de micronemas, róprias e grânulos densos, à medida que penetra na célula hospedeira, formando em seguida o vacúolo parasitóforo (Neves 2001; Carruthers and Boothroyd 2007).

A locomoção ocorre por *Gliding*, que é dependente de um sistema motor linear posicionado entre a membrana plasmática do parasito e um par de membranas conhecido como complexo inter membranoso. A mesma é controlada pela polimerização e despolimerização de filamentos de miosina e actina ancorados a esse sistema. Uma vez que o parasito encontra uma célula alvo para invadir ele se liga à superfície da mesma, por receptores ainda desconhecidos, e dá início ao processo de invasão. Para tanto, os conteúdos de micronemas, róprias e do conóide são excretados num processo dependente de cálcio. Essas proteínas liberadas formam um complexo denominado *Moving Junction* (MJ) que é responsável por ancorar, impulsionar e retirar proteínas extramembranas da membrana da célula hospedeira que irão participar do vacúolo parasitóforo em formação (Carruthers and Boothroyd 2007).

A formação da MJ e penetração são dependentes de proteínas armazenadas nos micronemas, que são estruturas em forma de bastão encontradas na extremidade anterior do protozoário e contém um grande número de proteínas glicosiladas, sintetizadas no retículo endoplasmático e armazenadas no aparato de Golgi (Carruthers and Tomley 2008). Elas são designadas como MIC 1, 2, etc, sendo conhecidas 11 até o momento e medeiam interações com componentes da superfície da célula hospedeira. Algumas estão envolvidas no processo de adesão do protozoário à superfície da célula hospedeira, funcionando como adesinas (Carruthers and Tomley 2008). Sabe-se que o conteúdo dos micronemas é liberado nos momentos iniciais da interação com a célula hospedeira, em um processo regulado por cálcio (Lovett, Marchesini et al. 2002).

Durante a penetração, há uma visível constrição em volta do parasito representando um movimento de junção entre a membrana plasmática da célula hospedeira e a membranas plasmáticas do parasito, formando o vacúolo parasitóforo. O vacúolo parasitóforo é derivado da invaginação da membrana celular do hospedeiro e é permeável a moléculas pequenas, tornando a composição iônica intravacuolar equivalente a do citoplasma da célula hospedeira. Posteriormente, o parasito modifica o vacúolo parasitóforo, secretando proteínas de grânulos densos dentro do espaço vacuolar, tornando esse compartimento metabolicamente ativo para o seu crescimento (Neves 2001; Melzer, Cranston et al. 2010).



**Figura 3: Modelo da invasão de *Toxoplasma gondii* na célula hospedeira.** Desenho esquemático dos processos que levam à invasão da célula hospedeira pelo parasito. Adaptado de Carruthers and Boothroyd 2007.

Uma vez que o vacúolo parasitóforo está completo e devidamente modificado o parasito dá início ao processo de multiplicação, conhecido como endogenia, que dá origem a células filhas e muitas vezes ao padrão característico de rosetas. Esses novos parasitos continuam se multiplicando e podem também se diferenciar, encistar ou invadir novas células (Black and Boothroyd 2000).

O próximo passo para a manutenção da infecção e encistamento, é a entrada do parasito no SNC e isso ocorre pelo rompimento da barreira hematoencefálica. Assim que o parasito entra no corpo, ele atravessa o epitélio intestinal ou placentário por transmigração paracelular (Barragan and Sibley 2002) e infecta células circulantes como macrófagos (Da Gama, Ribeiro-Gomes et al. 2004; Courret, Darche et al. 2006) ou células dendríticas (Courret, Darche et al. 2006; Lambert, Hitziger et al. 2006), e aparentemente as utiliza como “Cavalos de Tróia” para ter acesso a locais imunoprivilegiados como o cérebro (Carruthers and Boothroyd 2007).



## 1.6. Encistamento

Uma vez dentro da célula o parasito tem vários destinos, multiplicação, diferenciação com consequente encistamento e evasão. A multiplicação ocorre por endogenia, onde uma célula mãe da origem a duas células filhas e esse processo pode persistir até causar a lise da célula hospedeira liberando parasitos que irão infectar novas células (Black and Boothroyd 2000). A evasão é um processo diferente da lise celular e ocorre pela ação de proteínas similares à perforina presentes no parasito. Esse processo permite que o parasito migre de célula hospedeira em célula hospedeira ou mesmo entre diferentes vacúolos parasitóforos da mesma célula (Kafsack et al. 2009). A diferenciação do parasito de taquizoíto para a forma encistada de bradizoíto ocorre em etapas e principalmente no sistema nervoso central e no tecido muscular estabelecendo assim uma infecção a longo termo que é imune à ação de fármacos e do sistema imune (Carruthers and Boothroyd 2007).

A diferenciação de taquizoítos em bradizoítos é um processo ainda pouco conhecido e que leva a grandes transformações, não só do parasito, como da parede do vacúolo parasitóforo, que passa a ser denominada parede do cisto. A diferenciação é assincrônica e muitas vezes, no mesmo vacúolo, encontramos taquizoítos e bradizoítos (Dubey, Lindsay et al. 1998).

Inicialmente, o parasito passa por uma fase de bradizoíto imaturo, com morfologia de taquizoíto, mas com desaceleração da divisão e ocorrência de endopoligenias. Nessa fase também ocorre secreção dos componentes da parede do cisto e acúmulo de grânulos de amilopectina. Posteriormente o zoíto é denominado “quase maduro” e somente com a conclusão da formação da parede do cisto e todas as alterações morfológicas o zoíto é considerado um bradizoíto maduro. Nessa fase é considerado que a atividade mitocondrial é baixa ou escassa, mesmo com a organela se mantendo intacta. Dzierszinski e colaboradores, 2004 e outros autores já relataram que é possível encontrar parasitos com morfologia de taquizoítos, porém positivamente marcados para constituintes da parede de bradizoítos, mais uma vez confirmando que a diferenciação ocorre em etapas (Dzierszinski, Nishi et al. 2004).

O encistamento passou a ser estudado em 1952 por Lainson e colaboradores, mas com o desenvolvimento de métodos de detecção por imunomarcadores e microscopia eletrônica, novo interesse nessa forma tem surgido, principalmente por não existirem medicamentos para esse estágio (Fischer, Nitzgen et al. 1997; Black and Boothroyd 2000).

Estudos *in vitro* da cistogênese envolvem manipulação da cultura para estimular a diferenciação de taquizoítos em bradizoítos (Halonen, Weiss et al. 1998; Dzierszinski, Nishi et al. 2004). Dentre essas manipulações, as mais utilizadas são a alcalinização do pH (Weiss, Laplace et al. 1995), aumento da temperatura (Soete, Fortier et al. 1993) e adição de interferon gama (INF- $\gamma$ ) (Bohne, Heesemann et al. 1994) na cultura. Esses métodos aparentemente estão relacionados à indução de estresse e ativação do gene hsp70 nos parasitos, o que dá início ao processo de diferenciação (Weiss, Ma et al. 1998).

Apesar desses métodos serem eficazes na ativação da diferenciação e do encistamento, e de produzirem uma quantidade significativa de cistos (Weiss, Ma et al. 1998), eles afetam também a fisiologia das células estudadas. Poucos são os estudos sobre o encistamento espontâneo (Paredes-Santos, Martins-Duarte et al. 2013).

### **1.7. Patogenia**

A patogenia causada pelo parasito está relacionada não somente à lise causada pela multiplicação descontrolada, como também pelo sistema imune na tentativa de eliminar o agente agressor. A resposta imune é caracterizada por grande infiltrado inflamatório tipo Th1, macrófagos e linfócitos TCD8+ que liberam citocinas e quimiocinas que atraem mais células inflamatórias e aumentam os danos celulares (Yarovinsky and Sher 2006; Miller, Boulter et al. 2009).

Em indivíduos imunocompetentes a infecção por *T. gondii* não causa grandes consequências. Rapidamente o sistema imune é capaz de eliminar os taquizoítos circulantes e os que estão localizados no sistema nervoso, e tecido muscular, se diferenciam em bradizoítos presentes dentro de cistos e permanecem imunologicamente inertes (Saeij, Boyle et al. 2005). Essa etapa pode perdurar por toda a vida do hospedeiro, porém em casos de reagudização, ou de infecção por cepas extremamente virulentas, o indivíduo pode apresentar toxoplasmose ocular severa, com prejuízos à visão e à saúde (Saeij, Boyle et al. 2005).

Em indivíduos imunocomprometidos a infecção por *T. gondii* pode ter consequências graves, pois o sistema imune desses hospedeiros não é capaz de controlar a infecção e a alta carga parasitária leva a graves danos, principalmente no sistema nervoso central, causando a encefalite toxoplásmica que pode levar à morte (Bossi and Bricaire 2004).

As consequências mais graves da doença ocorrem quando fetos são infectados via transplacentária. Se o feto é infectado no início da gestação as consequências são mais graves, com formação de calcificações cerebrais, hidrocefalia, má formação, retinocoroidite, cegueira e até mesmo aborto. Nas fases finais da gestação a probabilidade que o feto se infecte, caso a mãe tenha o primeiro contato com o parasito, é maior, porém as consequências para o feto são menos graves (Dubey, Ferreira et al. 2012).

Devido à importância do acometimento do sistema nervoso nessa doença, e nosso interesse na biologia celular de neurônios, é importante estudar aspectos estruturais do sistema nervoso e dos neurônios, como potenciais sítios de infecção.

### **1.8. Sistema nervoso**

O sistema nervoso é dividido em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). Este último é ainda dividido em somático que controla as funções voluntárias dos músculos esqueléticos e é controlado diretamente pelo SNC e em autonômico, que inerva estruturas de movimento involuntário, como vísceras, glândulas salivares, vasos sanguíneos, músculos lisos e o coração e é relativamente independente do controle do SNC. O sistema nervoso autonômico (SNA) é ainda dividido em simpático e parassimpático, que tem funções antagônicas (Purves, Augustine et al. 2001).

Em nosso laboratório temos utilizado como modelo para a interação parasito/hospedeiro culturas primárias de neurônios retirados do gânglio cervical superior (GCS) de camundongos neonatos. Os neurônios do gânglio cervical superior pertencem ao SNP simpático e são multipolares, com grande variabilidade de aparência em seus prolongamentos. A maioria deles são noradrenérgicos e apresentam positividade para reação imunocitoquímica à tirosina hidroxilase, uma enzima essencial na síntese das catecolaminas (Masliukov and Timmermans 2004).

O GCS é considerado um bom modelo para correlações entre morfologia, função e metabolismo dos neurônios. Esse gânglio tem uma organização relativamente simples e se localiza bilateralmente na base do crânio e aderido à bifurcação da artéria carótida. As células que compõem o gânglio são neurônios, células pequenas intensamente fluorescentes (SIF), células da glia satélites (Chiba and Williams 1975; Hedger and Webber 1976; Madariaga-

Domich and Taxi 1986) células de Schwann, células endoteliais e fibroblastos (Roivainen and Koistinaho 1996). Estímulos fisiológicos, injúria, envelhecimento e infecção por parasitos causam alterações morfológicas no GCS. Além disso, esse gânglio mantém transmissão sináptica e alta taxa metabólica durante incubações *in vitro* (Roivainen and Koistinaho 1996). A cultura de neurônios do gânglio cervical superior foi primeiramente estabelecida a partir de ratos por Mains e colaboradores, 1973 e desde então tem sido muito utilizada como ferramenta para o estudo da funcionalidade e morfologia de neurônios, como também para o estudo de lesões neuronais (Mains and Patterson 1973; Lonchamp, Dupont et al. 2006).

Embora seja elaborado isolar e manter células primárias, que no caso dos neurônios não se multiplicam, apresentando limitações importantes no número de células e amostras obtidas, os estudos com células primárias são muito valorizados por possibilitarem o acesso a células não imortalizadas, bem diferenciadas e fisiologicamente semelhantes às células obtidas dos tecidos de interesse (Lonchamp, Dupont et al. 2006). Há várias vantagens em se estudar aspectos da biologia da célula neuronal *in vitro*, bem como sua resposta a estímulos ou agentes agressores. Entre eles, a documentação precisa de fenômenos tais como expressão gênica, metabolismo celular, transdução de sinais, crescimento e proliferação, interação receptor-ligante e interação entre células (Roivainen and Koistinaho 1996). Culturas neuronais oferecem inúmeras vantagens em relação as técnicas *in vivo*. A morfologia celular, síntese proteica, metabolismo energético, interação de receptores, captação e liberação de neurotransmissores, assim como captação e liberação de estímulos elétricos, podem ser mais facilmente estudados (Aschner and Syversen 2004).

### **1.9. Toxoplasmose e o sistema nervoso**

Estudos *in vitro* utilizando células do cérebro de camundongos demonstraram que taquizoítos são capazes de infectar micróglia (Chao, Anderson et al. 1993; Fischer, Nitzgen et al. 1997), astrócitos, (Jones, Bienz et al. 1986; Halonen, Chiu et al. 1998) e neurônios (Schwartzman 1987), formando cistos em todas essas células (Jones, Bienz et al. 1986). Estudos envolvendo microscopia eletrônica em cérebros de camundongos com infecção crônica demonstraram que a maioria dos cistos se encontram dentro de neurônios (Ferguson and Hutchison 1987), sendo que estes foram encontrados em axônios, dendritos, ou no corpo celular dos neurônios (Ferguson and Hutchison 1987).

Os efeitos de *T. gondii* no sistema nervoso podem ser percebidos quase que imediatamente, como mostrado por Blader e colaboradores, 2001, que usou taquizoítos da linhagem tipo II para examinar a expressão gênica da célula hospedeira em fibroblastos de humanos. Nas primeiras duas horas de infecção ocorre um aumento na produção de proteínas relacionadas com a resposta imune (Blader, Manger et al. 2001). O parasito, 24 horas pós-infecção, já se replicou por endogenia duas ou quatro vezes e uma variedade de vias glicolíticas do hospedeiro são reguladas positivamente em resposta ao aumento da demanda metabólica causada pela presença do parasito. Taquizoítos intracelulares são também capazes de manipular diversos sinais de transdução relacionados a apoptose (Carmen, Hardi et al. 2006; Kim and Denkers 2006), mecanismos microbicidas (Kim, Butcher et al. 2006; Zimmermann, Murray et al. 2006) e a maturação de células imunes (McKee, Dzierszinski et al. 2004).

Investigações ultraestruturais utilizando camundongos infectados por *T. gondii* mostraram que os neurônios parecem ser as células hospedeiras em que o parasito mais resiste *in vivo* (Sims, Hay et al. 1989). No entanto, bradizoítos encistados também foram descritos em culturas primárias de astrócitos humanos e de camundongos, além de em células microgliais murinas (Jones, Bienz et al. 1986; Halonen, Lyman et al. 1996; Fischer, Nitzgen et al. 1997). Em contrapartida, Fagard e colaboradores, 1999, demonstraram que neurônios hipocâmpais de rato foram infectados de maneira menos eficiente por *T. gondii* em relação aos astrócitos (Fagard, Van Tan et al. 1999).

Normalmente o parasito encista em neurônios, o que explica as desordens neurológicas observadas em pacientes, principalmente nos imunocomprometidos. Além disso, quando *T. gondii* invade a célula hospedeira ele forma o vacúolo parasitóforo (VP) que contém proteínas Rop2 na membrana que ancoram o VP à mitocôndria da célula hospedeira. Essa estratégia contribui para impedir a fusão do lisossomo da célula hospedeira com o VP possibilitando o desenvolvimento intracelular (Sinai and Joiner 2001). Dessa forma, células com alto número de mitocôndrias, como os neurônios, parecem ser o alvo primário do protozoário (Papazian-Cabanas, Araujo et al. 2012). Além da infecção no SNC, estudos têm descrito a infecção no sistema nervoso periférico (SNP), principalmente em neurônios mientéricos (Sugauara, Sant'Ana Dde et al. 2008) devido ao fato da transmissão do parasito se iniciar por via oral, porém os resultados permanecem controversos. Os neurônios autonômicos do GCS, ainda não foram testados para a infecção *in vitro* por *T. gondii*. Alguns trabalhos que estudam a interação do parasito com o SNP, descreveram perda neuronal no plexo mientérico (Sugauara,

Sant'Ana Dde et al. 2008) enquanto Barbosa et, al. descreveram apenas atrofia com redução da área do pericário, do núcleo e na razão entre núcleo/pericário dos neurônios (Barbosa, Araújo et al. 2009).

Desse modo, um modelo potencial para se estudar a interação *T. gondii*/neurônio no SNP é a utilização da cultura primária de neurônios do gânglio cervical superior. Em nosso laboratório um modelo de cultura de neurônios autonômicos periféricos do gânglio cervical superior vem sendo utilizado para estudar a interação de células da glia e neurônios com parasitos (Almeida-Leite, Galvao et al. 2007; Souza 2007; Esper, Roman-Campos et al. 2012). Em todo o mundo, aproximadamente dois bilhões de pessoas estão cronicamente infectadas com *T. gondii* com consequências amplamente desconhecidas (Hermes, Ajioka et al. 2008), sendo, portanto, de fundamental importância, buscar a compreensão dos fenômenos propiciados pela interação parasito/hospedeiro.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Análise e descrição da resposta diferencial de neurônios e de células da glia do gânglio cervical superior à invasão pela cepa brasileira de genótipo atípico, TgCTBr9, de *Toxoplasma gondii*, isolada de recém-nascido humano diagnosticado com toxoplasmose congênita, quanto aos aspectos estruturais e funcionais *in vitro*.

### **2. 1. Objetivos específicos**

Analisar e descrever a cinética e as taxas de infecção de neurônios e de células da glia por *T. gondii in vitro* nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 192 horas;

Verificar e descrever as características morfológicas das células em cultura, através de técnicas de biologia celular e imunomarcações para proteínas estruturais e do citoesqueleto de neurônios ( $\beta$  tubulina III e tirosina hidroxilase);

Verificar se há formação de cistos em cultura e descrevê-los através de técnicas de imunomarcação;

Verificar e descrever a presença do parasito em células da glia e neurônios através de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Matrizes de camundongos da linhagem C57BL/6 foram fornecidas pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO), UFMG e utilizadas para o estabelecimento de colônias mantidas no biotério do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas ICB/UFMG. As culturas primárias de neurônios foram realizadas pela dissecação do GCS de neonatos de até três dias (8 a 12 por experimento, sendo necessário no mínimo 3 repetições independentes). Esses animais foram obtidos de cruzamentos programados a partir da colônia inicial. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), da UFMG, de acordo com protocolo nº 379/2012 (ANEXO 1).

#### **3.2. Obtenção e manutenção da cepa**

A cepa TgCTBr9 foi isolada a partir de humano recém-nascido e diagnosticado com toxoplasmose congênita e foi mantida no laboratório do Prof. Ricardo Wagner de Almeida Vitor, do Departamento de Parasitologia ICB/UFMG, como descritas no item 3.5.

#### **3.3. Eutanásia dos neonatos e retirada dos gânglios**

Os camundongos neonatos foram eutanasiados por decapitação. Após a retirada dos gânglios, os mesmos foram mantidos em gota de meio de cultura estéril (Minimum essencial medium; MEM, 31095-029, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, 16140-071, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e com os antibióticos Penicilina (100 UI/ml, P4333, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e Estreptomicina (10.000 µg/ml, P4333,36Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em uma placa de cultura de 60 mm – à temperatura ambiente, em uma placa de Petri estéril e tampada. Uma dissociação enzimática foi feita com tripsina 0,25% por uma hora em uma incubadora de CO<sub>2</sub>. Após a dissociação enzimática, 1ml de meio completo foi adicionado ao tubo e a dissociação mecânica foi feita aspirando-se vigorosamente o meio com uma pipeta de Pasteur, até a completa dissociação dos gânglios (Arantes, Lourenssen et al. 2000).



### 3.4. Plaqueamento de células

As células foram plaqueadas em presença de NGF (N-100, Alomone, Jerusalem, Israel) na concentração de 50 ng/ml sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro tratadas com uma fina camada de Matrigel (354234, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA). A densidade mínima de  $2 \times 10^4$  células plaqueadas por poço garantiu um padrão adequado de densidade e distribuição das células em cultura (Arantes, Lourenssen et al. 2000).

### 3.5. Infecção por *Toxoplasma gondii* in vitro

O isolado de *T. gondii*, TgCTBr9, foi obtido por Carneiro e colaboradores, 2013, juntamente com o programa de triagem neonatal para Toxoplasmose congênita da Faculdade de Medicina da UFMG (Carneiro, Andrade et al. 2013).

Para manutenção do novo isolado foram utilizadas novas passagens em fêmeas de camundongos Swiss através da inoculação de cistos teciduais encontrados nos cérebros dos animais previamente infectados. Foram inoculados aproximadamente cinco a dez cistos presentes em cérebro dos camundongos infectados previamente, após homogeneização do órgão em PBS pH 7,2, a cada 4-6 meses, por via oral em camundongos Swiss normais. Por ser um isolado virulento, os camundongos eram tratados 48 horas após o inóculo com sulfadiazina (1g/L) na água oferecida aos animais, durante sete a dez dias. O isolado também foi mantido por congelamento de taquizoítos em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Para obtenção de taquizoítos, foram inoculados três a quatro camundongos com aproximadamente 100 a 200 cistos da cepa TgCTBr9 i.p. por camundongo. Os taquizoítos foram coletados seis a oito dias após o inóculo através de lavagem do peritônio com PBS pH 7,2. O material coletado foi processado para rompimento e deposição de células. Inicialmente, foi passado por uma agulha de insulina (BD Ultra-fine) para romper células infectadas. Em seguida o material resultante foi filtrado através de membrana de policarbonato com poros de  $3\mu\text{m}$  para reter as células maiores (Ferreira, Martins et al. 2001) e, centrifugado a 2000g por 10 minutos com PBS pH 7,2, e ressuspensionado em DMEM. Essa solução de taquizoítos foi plaqueada nas culturas primárias na concentração de 1:10.

Após ressuspensão dos parasitos em meio DMEM incompleto, a solução foi adicionada às culturas a uma taxa 1:10 (célula hospedeira/parasito) e permaneceram nas culturas primárias

por três horas em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C. Nas culturas controle (não infectadas) foi adicionada a mesma quantidade de DMEM puro. Em seguida os taquizoítos não aderidos foram removidos pela adição e remoção, por duas vezes, de 500µL de meio DMEM incompleto nos poços. Após a lavagem dos poços, foi adicionado 500µL de meio DMEM completo acrescido de NGF em cada poço. Em algumas culturas também foi adicionado Ara-C. Todas as culturas permaneceram na incubadora pelos tempos experimentais de 24, 48, 72, 96 e 192 horas. Após esses tempos as mesmas foram fixadas e utilizadas para documentação fotográfica, coloração e reações de imunofluorescência.

### **3.6. Fixação das culturas**

As lamínulas de cultura foram fixadas à temperatura ambiente por no mínimo uma hora, com formaldeído tamponado a 10%, nos devidos tempos experimentais. As lamínulas destinadas para microscopia eletrônica foram fixadas com glutaraldeído grade 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 – 7,4.

### **3.7. Documentação fotográfica**

Uma vez fixadas, as culturas foram fotografadas utilizando o microscópio invertido Olympus IX71 equipado com câmera Hamamatsu Orca II cooled CCD e software MetaMorph, para análise de características morfológicas das células.

Após imunofluorescência ou coloração por PAS ou Gaffney's one-hour Giemsa, as lamínulas foram fotografadas utilizando o microscópio óptico Olympus BX51 equipado com o software Image-Pro Express 4.0 (Media Cybernetics, MD, EUA).

### **3.8. Coloração**

Gaffney's one-hour Giemsa foi utilizado para determinação da taxa de infecção por ser uma coloração que evidencia a presença do parasito. Para tanto as lamínulas foram lavadas quatro vezes com PBS 1X, seguido de uma lavagem de 5 minutos com PBS 1X e duas lavagens com água deionizada de 5 minutos cada. Posteriormente foi acrescida aos poços com lamínulas a solução de Giemsa por 15 minutos. Após esse período a solução foi retirada e os poços foram lavados com água acética e depois com água deionizada por 5 minutos. Após secagem as lamínulas foram fixadas com Ery-Mount (EasyPath, Brasil) e analisadas.

Ácido-periódico de Schiff foi utilizado para a evidenciação de bradizoítos dentro de células infectadas. Inicialmente as lamínulas foram lavadas quatro vezes com PBS 1X, seguido de uma lavagem em água corrente da torneira por 5 minutos e um mergulho em água deionizada. Posteriormente, foi acrescido aos poços com lamínulas o ácido periódico de Schiff 0,5% por 5 minutos. Após esse período as lamínulas foram mergulhadas em água deionizada e no Reativo de Schiff por 10 minutos. A solução foi então retirada e os poços foram lavados em água corrente da torneira por 5 minutos e um mergulho em água deionizada. Para contra coloração as lamínulas foram mergulhadas em hematoxilina 1:3, lavadas em água corrente da torneira por 10 minutos e mergulhadas em alcoóis 70, 80 e 90%, em seguida nos alcoóis absolutos I e II e após secagem as lamínulas foram fixadas com Erv-Mount (EasyPath, Brasil) e analisadas.

### **3.9. Imunofluorescência**

As culturas foram submetidas à técnica de imunofluorescência para a avaliação da expressão dos marcadores descritos no quadro 1, com seus respectivos anticorpos secundários. Os anticorpos foram escolhidos para identificação das alterações estruturais e funcionais das células em cultura. Sendo assim, anti- $\beta$ -tubulina III foi utilizado para detectar mudança na rede de microtúbulos de neurônios e anti-NeuN foi utilizado para marcar neurônios. Optamos por anti-tirosina hidroxilase como um marcador da funcionalidade celular com a presença do parasito uma vez que essa enzima é produzida constitucionalmente em neurônios simpáticos normais. Para marcação do parasito, utilizamos soro anti-toxoplasma e anti-BAG (Bradyzoite specific BAG1 proteins), presente na membrana do taquizoíto e do bradizoíto respectivamente. Para cinética da formação de cisto utilizamos a lectina fluorescente *Dolichos biflorus* Agglutinin (DBA).

Após fixação em formaldeído tamponado a 10% as lamínulas foram lavadas com PBS (Phosphate buffer saline) 10% e permeabilizadas com a solução de PBS 10% + BSA 1% + TritonX 0,25% (Soro Albumina Bovina, Inlab, Brasil) por 5 minutos seguida de incubação em soro normal de cabra na concentração de 1:20 (SNC, Cripion Biotechnology, Brasil) por 45 minutos à temperatura ambiente. As células foram então incubadas com os anticorpos primários, chicken anti-NeuN (1:500, Millipore, EUA), mouse anti-tubulin  $\beta$  III isoform (1:1000, Millipore, EUA) ou rabbit anti-tirosina hidroxilase (1:300, Millipore, EUA) à 4°C overnight. As células foram lavadas com PBS 10% + BSA 1% e incubadas com os anticorpos secundários, Alexa Fluor 546 goat anti-chicken IgG (1:400, Invitrogen, EUA), 546 goat anti-

mouse (1:400; Invitrogen, EUA) ou 488 goat anti-rabbit (1:400, Invitrogen, EUA) respectivamente, por 30 minutos à temperatura ambiente. Para observação do núcleo e sua caracterização morfológica foi utilizado a sonda Hoechst na diluição 1:200 (H1399, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Como controle técnico utilizamos uma lamínula infectada em que foi omitido o anticorpo primário. As lamínulas foram montadas utilizando Fluorescent Mounting Medium (DAKO, Carpinteria, CA, EUA) e analisadas após secagem.

Para marcação do parasito foi utilizada a mesma metodologia descrita acima, porém as células foram incubadas com os anticorpos primários mouse anti-BAG (1:100, generosamente cedido pela Dra. Rossiane C. Vommaro, UFRJ), lectina fluorescente *Dolichos biflorus Agglutinin*, DBA (1:5, Vector Laboratories) e rabbit anti-toxoplasma (1:1000) (Ferreira, Martins et al. 2001) à 37°C overnight. Posteriormente as células foram incubadas com anticorpos secundários, Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:400, Invitrogen, EUA), para anti-toxoplasma e Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (1:400, Invitrogen, EUA) para anti-BAG por 2 horas à 37°C.

**Quadro 1:** Anticorpos e lectinas utilizados

Nome do Anticorpo	Marca e referência comercial	Origem e diluição	Sistema de detecção/anticorpo secundário	Diluição anticorpo secundário	Tipo celular
NeuN	Millipore, ABN91	Policlonal de galinha 1:500	Alexa fluor 546 goat anti-chicken IgG (Invitrogen, EUA)	1:400	Neurônio
$\beta$ -tubulina	Milipore, mab1637	Monoclonal de camundongo 1:1000	Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, EUA)	1:400	Citoesqueleto de neurônios
tirosina hidroxilase	Milipore, ab152	Policlonal de coelho 1:300	Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, EUA)	1:400	Neurônio
BAG	Cordialmente cedido pela profa. Rossiane C. Vommaro da UFRJ	Monoclonal de camundongo 1:100	Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, EUA)	1:400	Membrana de bradizoíto
DBA	Vector Laboratories, FL-1031	1:5	-	-	Parede do cisto
Soro anti-toxoplasma	Produzido pelo prof. Ricardo W. de A. Vitor da UFMG	Policlonal de coelho 1:1000	Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, EUA)	1:400	Membrana de taquizoítos

### **3.10. Determinação da taxa de infecção**

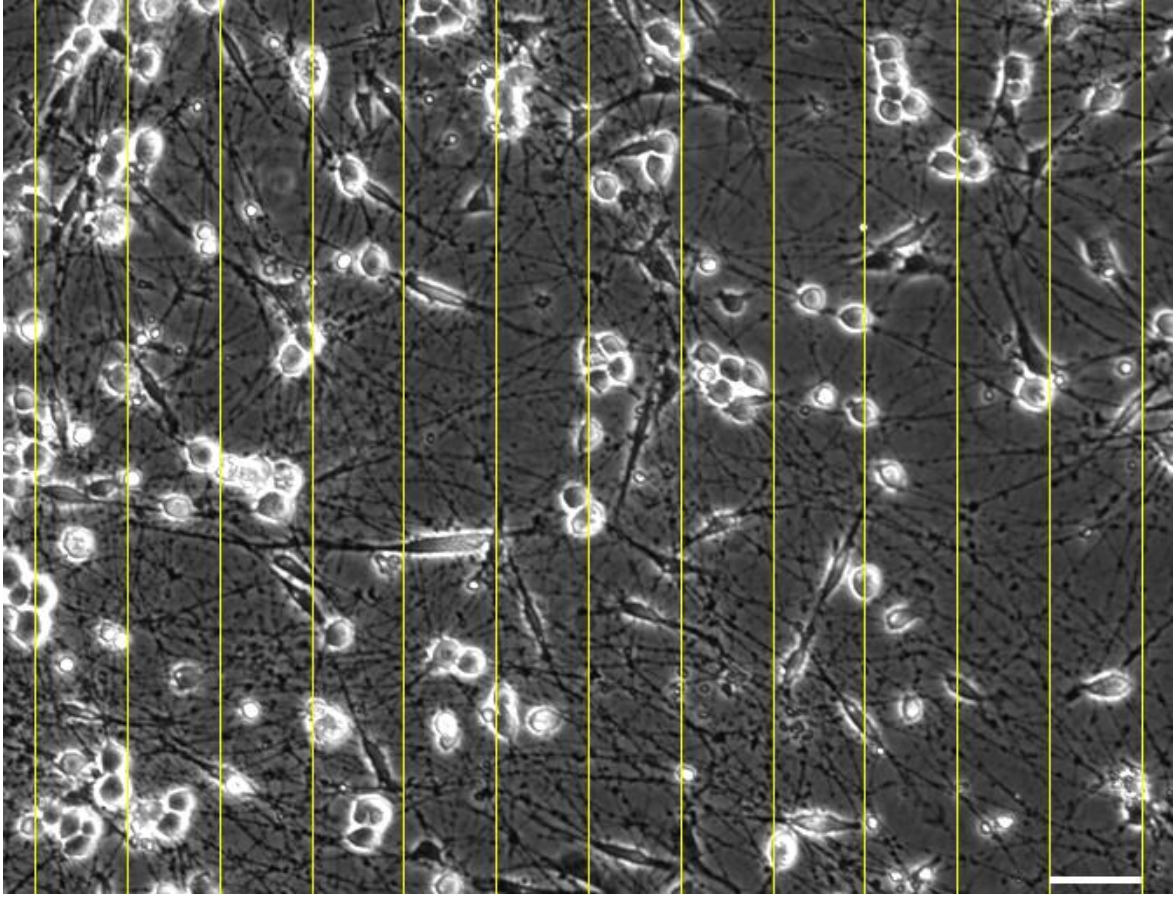
A avaliação da taxa de infecção foi feita utilizando culturas fixadas e coradas com a solução Gaffney's one-hour Giemsa. Em cada lamínula, 300 células foram contadas em microscópio óptico Olympus BX51 em objetiva de imersão e essas células foram diferenciadas entre célula da glia não infectada, célula da glia infectada, neurônio não infectado e neurônio infectado.

### **3.11. Determinação da taxa de diferenciação**

A avaliação da taxa de diferenciação assincrônica, em etapas, de taquizoítos em bradizoítos foi realizada pela coloração com PAS (Ácido-periódico de Schiff) que cora os grânulos de amilopectina presentes nos bradizoítos. Sendo assim, a avaliação da diferenciação considerou como bradizoítos, parasitos intensamente corados em púrpura pelo PAS (Dubey, Lindsay et al. 1998). Em cada lamínula, 300 células foram contadas em microscópio óptico Olympus BX51 em objetiva de imersão e essas células foram diferenciadas entre célula da glia não infectada, célula da glia infectada, neurônio não infectado e neurônio infectado.

### **3.12. Análise quantitativa da densidade neurítica**

A análise da densidade neurítica das culturas primárias de neurônios foi realizada após a fixação das mesmas com formol tamponado a 10% e estas foram fotografadas no microscópio invertido Olympus IX71 equipado com câmera Hamamatsu Orca II cooled CCD e o software MetaMorph. Foram obtidas 10 imagens com a objetiva de 10X da área de maior densidade celular de cada lamínula. Os neurônios foram distinguidos das células da glia por suas características morfológicas. A densidade neurítica foi avaliada pela contagem dos neuritos em culturas de 24 horas após infecção. Para isso uma linha vertical (250 $\mu$ m) foi superposta nas imagens num intervalo de 1,5cm e o número de neuritos que cruzaram as linhas (interseções) foi contado (Figura 4).



**Figura 4: Grade para determinação da densidade neurítica.** Cultura infectada de 72 horas. Barra representa 1,5cm. Aumento de 1000X.

### 3.13. Análise quantitativa da sobrevivência celular

A análise quantitativa dos corpos celulares de neurônios das culturas primárias com glia foi realizada após fixação das mesmas com formol tamponado a 10% e estas foram fotografadas no microscópio invertido Olympus IX71 equipado com câmera Hamamatsu Orca II cooled CCD e o software MetaMorph. Foram obtidas 10 imagens com a objetiva de 10X da área de maior densidade celular de cada lamínula. Os neurônios foram distinguidos das células da glia por suas características morfológicas. O número de corpos neuronais foi contado nos 10 campos fotografados utilizando o software gratuito ImageJ 1,48.

### 3.14. Análise qualitativa das culturas

Foram avaliados neurônios morfológicamente viáveis como sendo aqueles com neuritos intactos, diâmetro uniforme e corpo celular com aparência normal. A infecção foi estudada nos corpos neuronais e nas terminações nervosas através da observação e documentação fotográfica dos sinais de edema celular, granulose das células, redução do brilho sob

microscopia de contraste de fase e alterações progressivas na integridade neuronal e neurítica. Neurônios com neuritos fragmentados e corpo celular vacuolizado foram considerados não viáveis. As células da glia também foram acompanhadas.

### **3.15. Análise estatística**

Os resultados foram obtidos de pelo menos três experimentos independentes e a significância estatística avaliada pelo teste t de student ou One-Way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls. Valores de probabilidade  $\leq 0.05$  foram considerados significantes. Os testes estatísticos foram feitos pelos softwares GraphPad Prism 5.0 e InStat.

## 4. RESULTADOS

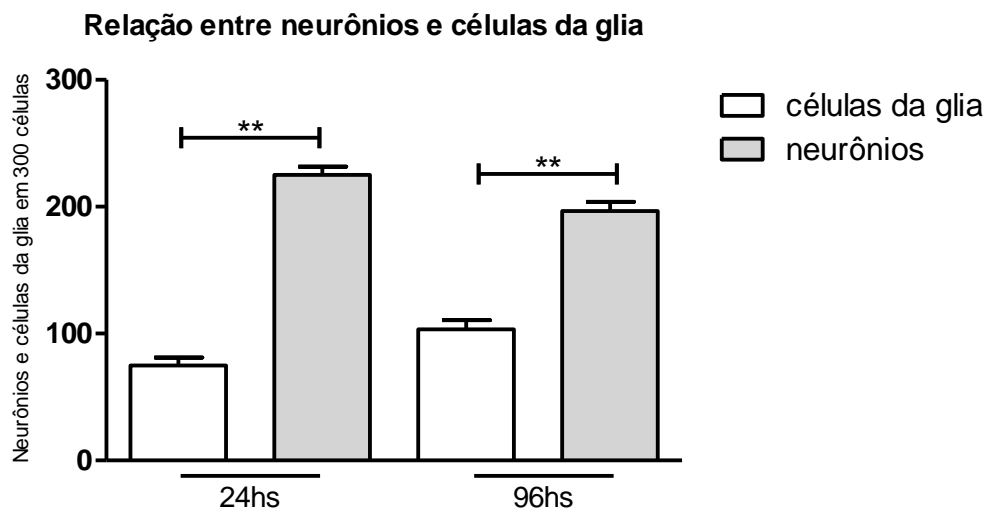
### 4.1. Padronização das culturas

#### 4.1.1. Proporção do número de células em cultura

Inicialmente as culturas foram avaliadas quanto à proporção dos tipos celulares encontrados (neurônios/células da glia).

Para tanto, 300 células das culturas controle, coradas por Giemsa, foram contadas no centro da lamínula e discriminadas entre neurônios e células da glia.

A relação de neurônios para células da glia nas culturas mistas diminuiu ao longo dos tempos estudados apresentando uma proporção de 3:1 para 2:1, neurônios:células da glia, entre as culturas de 24 e 96 horas (Figura 5). As culturas de tempos maiores apresentaram impossibilidade de documentação fotográfica devido à maior espessura resultante do aumento exponencial de células da glia e trama neurítica.

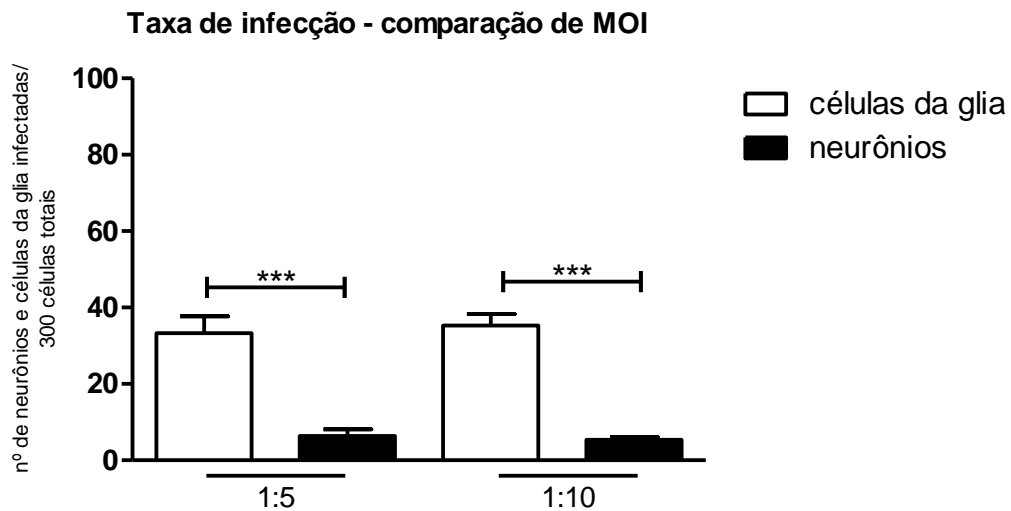


**Figura 5: Relação de neurônios e células da glia do gânglio cervical superior em culturas controle.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram coradas com Gaffney's one-hour Giemsa e em cada uma delas 300 células foram contadas e diferenciadas entre célula da glia e neurônios. One-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls.  $**p < 0,001$  comparando neurônios e células da glia, representativo de três experimentos independentes,  $n=9$ .



#### 4.1.2. Taxa de infecção de neurônios e células da glia

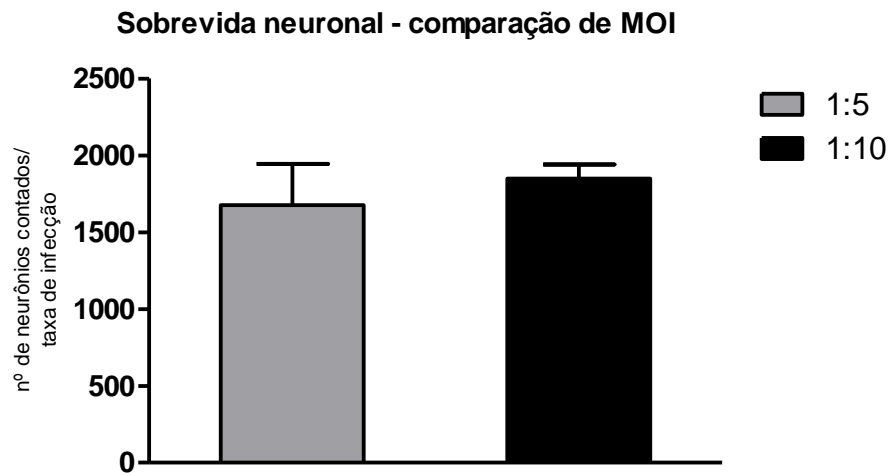
Nas culturas primárias de 24 horas de neurônios e células da glia não foi encontrada diferença estatística entre as taxa de infecção de 1:5 e 1:10, células/parasito. Em relação às células infectadas, observamos preferência de infecção em células da glia, tanto em infecções 1:5, quanto 1:10 (Figura 6).



**Figura 6: Determinação da taxa de infecção das culturas primárias de neurônios e células da glia.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:5 e 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubados pelo restante do tempo experimental de 24 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram coradas com Gaffney's one-hour Giemsa e em cada uma delas 300 células foram contadas e discriminadas como célula da glia não infectada, célula da glia infectada, neurônio não-infectado e neurônio infectado. One-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls. \*\*\* $p < 0,0001$  comparando glia e neurônios, representativo de três experimentos independentes,  $n=9$ .

### 4.1.3. Análise da sobrevivência neuronal

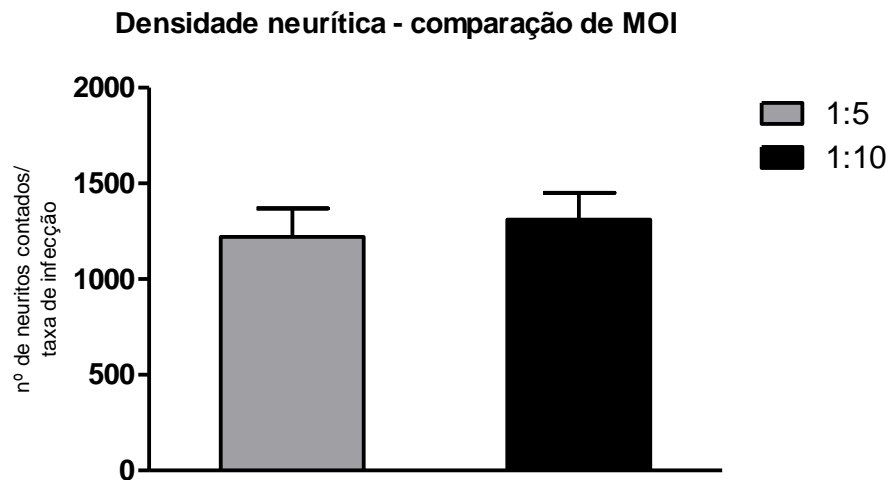
Buscando avaliar se há mortalidade neuronal após infecção pelo parasito nas culturas mistas de 24 horas, e se a taxa de infecção interfere nesse processo, realizamos a contagem dos corpos neuronais e observamos que não houve diferença estatística entre culturas infectadas e o controle em nenhuma das taxas de infecção (Figura 7).



**Figura 7: Determinação do número de corpos neuronais das culturas primárias de neurônios e células da glia com relação à taxa de infecção.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:5 e 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubados pelo restante do tempo experimental de 24 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram fotografadas em microscópio invertido e submetidas à contagem dos corpos neuronais. Comparação de culturas 1:5 e 1:10, representativo de três experimentos independentes, n=9.

#### 4.1.4. Análise da densidade neurítica

Visando avaliar a funcionalidade neuronal frente à infecção pelo parasito, nos perguntamos se a densidade neurítica se encontrava alterada. A avaliação das culturas mistas de 24 horas não apresentou diferença estatística entre as taxas de infecção 1:5 e 1:10, célula/parasito (Figura 8).



**Figura 8: Determinação da densidade neurítica das culturas primárias de neurônios e células da glia com relação à taxa de infecção.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:5 e 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubados pelo restante do tempo experimental de 24 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram fotografadas em microscópio invertido e submetidas à contagem. Resultado representativo de três experimentos independentes, n=9.

A partir dos resultados anteriores e visando garantir a infecção, nós nos concentramos no estudo de infecções na taxa de 1:10, célula hospedeira/parasito, para descrição da cinética de interação de culturas primárias de neurônios e células da glia do gânglio cervical superior com a cepa TgCTBr9 de *Toxoplasma gondii*.

## 4.2. Cinética das alterações morfológicas em campo claro das culturas

Na microscopia de campo claro, culturas controle apresentaram neurônios com rede neurítica bem estabelecida e preferencialmente distribuída no centro da lamínula. Essas células eram poligonais, globóides, com cones de crescimento evidentes a partir das bordas do corpo celular, birrefringentes e que não podiam ser focadas em um único plano. A rede neurítica formada a partir dos neurônios era interceptada e aderida a outros neurítos, assim como à superfície de outros neurônios e de células da glia. Essas extensões frequentemente estavam englobadas por processos citoplasmáticos das células da glia e apresentavam varicosidades características de neurônios simpáticos (rosary-bead-like formations). Os corpos celulares de neurônios eram intercalados por células morfológicamente descritas como células da glia (achatadas, com citoplasma grande, núcleo reniforme, algumas vezes com nucléolo evidente, aderidas ao substrato e emitindo prolongamentos).

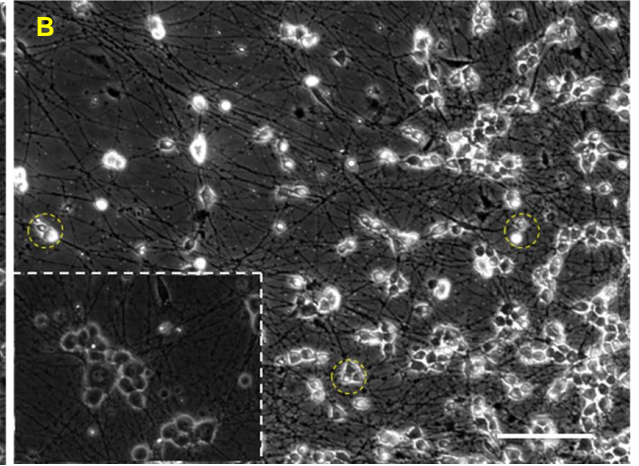
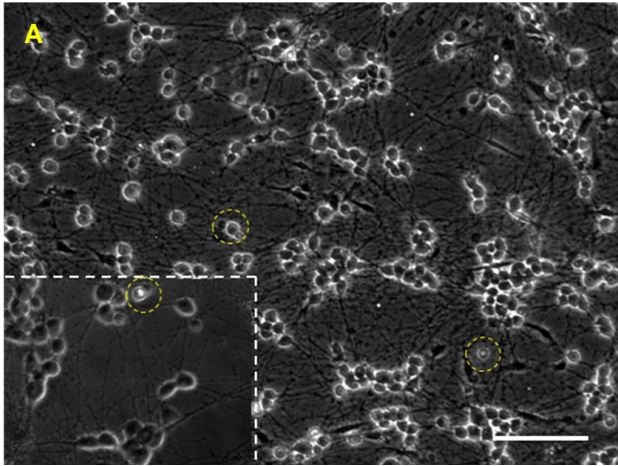
Esse padrão também foi encontrado em culturas infectadas em todos os tempos. Culturas infectadas mostraram alterações morfológicas discretas em comparação com os controles. Neurônios e células da glia infectados apresentavam citoplasma aumentado e varicosidades também aumentadas (ver Figuras 13A e 22F). Também observamos evidência de encolhimento e processos necrótico-degenerativos em algumas células. Na maioria das vezes a presença do parasito dentro das células infectadas foi demonstrada sem perturbação da morfologia dessas células (Figura 9). Com 24 horas já encontramos a presença de uma estrutura dilatada que aparece nos neurítos, distante dos corpos neuronais, que pode ser identificada no campo claro (Figura 13A e insert). Na dupla marcação para  $\beta$ -tubulina e DBA (Figura 21E) observamos aspectos da mesma estrutura que se co-localiza com marcador do citoesqueleto de neurônios. Também observamos o aspecto do núcleo dos parasitos marcados por Hoechst, e colocalizados com a tirosina hidroxilase (Figura 22F).

**Figura 9: Imagem de campo claro das culturas primárias controle e infectadas de neurônios e células da glia.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguido de infecção 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubação nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram fotografadas e analisadas. **A, C, E e G** culturas controle de 24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente, mostrando rede neurítica extensa, neurônios birrefringentes e arredondados intercalados por células da glia achatadas e com prolongamentos extensos. Em todos os tempos é possível observar encolhimento de algumas células (círculo). **B, D, F e H** representam culturas infectadas de 24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente. Em **B e D** observamos que a cultura infectada é semelhante ao controle, também apresentando encolhimento de células (círculo) e em **D** podemos observar neurônios infectados (seta). Em **F e H**, além do encolhimento (círculos), é possível observar células aumentadas devido à presença do parasito no citoplasma (seta). Barra representa 10µm. Aumento de 100X. Inserts no aumento de 400X.

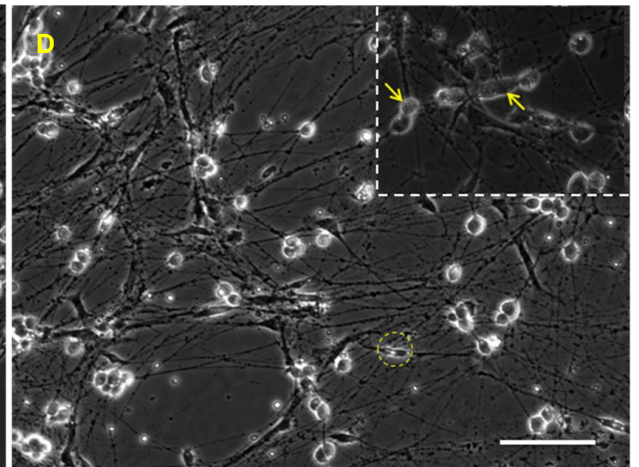
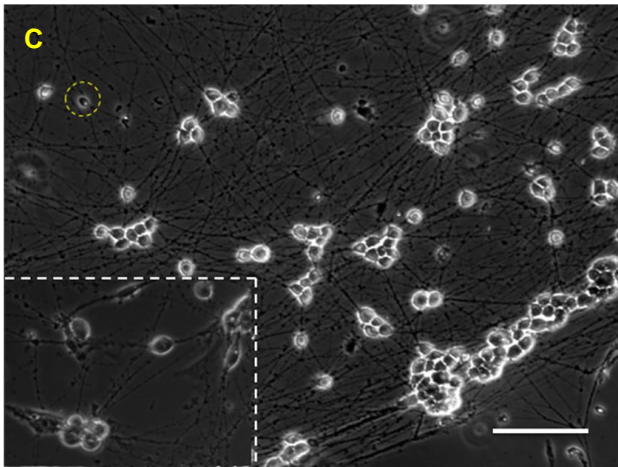
Controle

Infectado 1:10

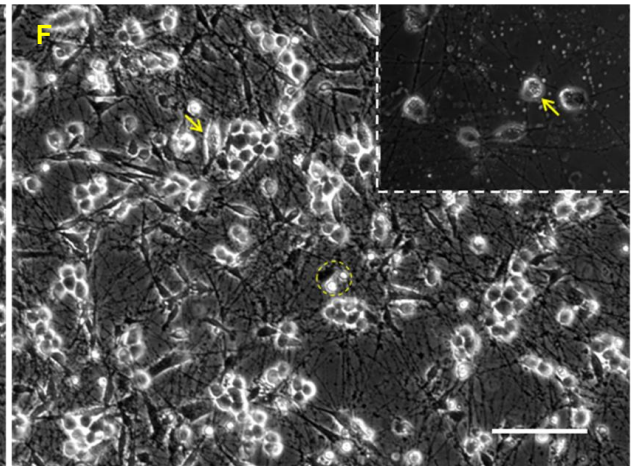
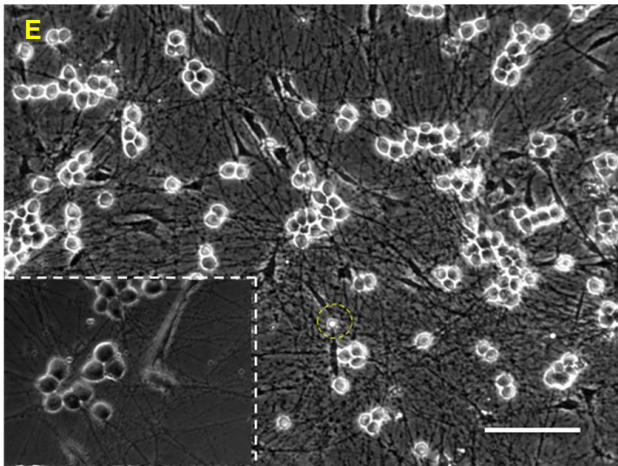
24h



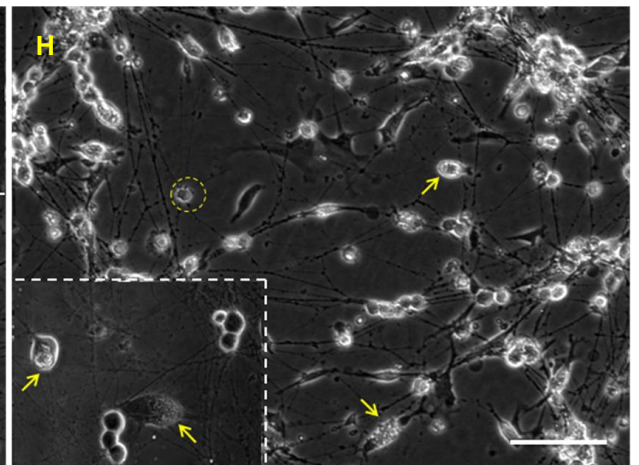
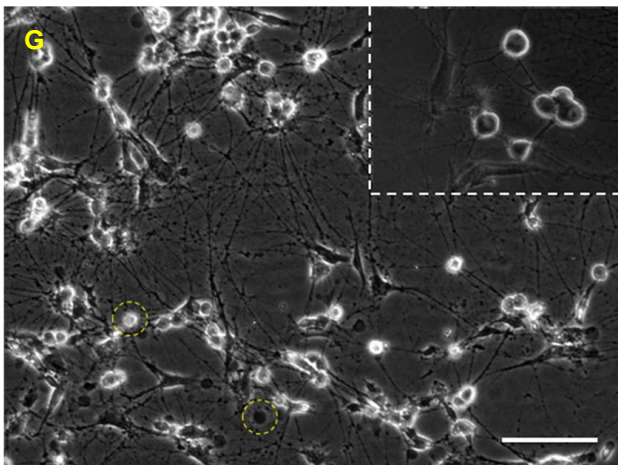
48h



72h

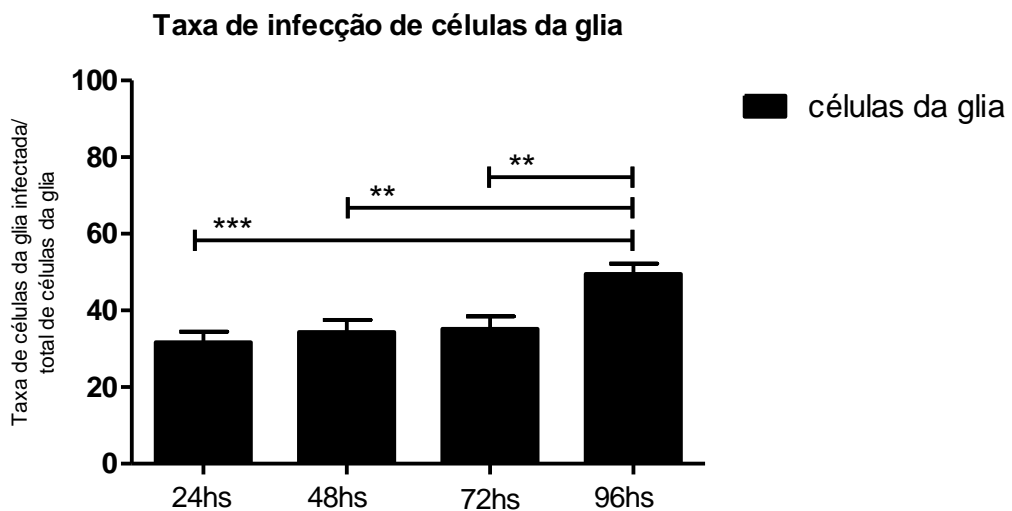


96h

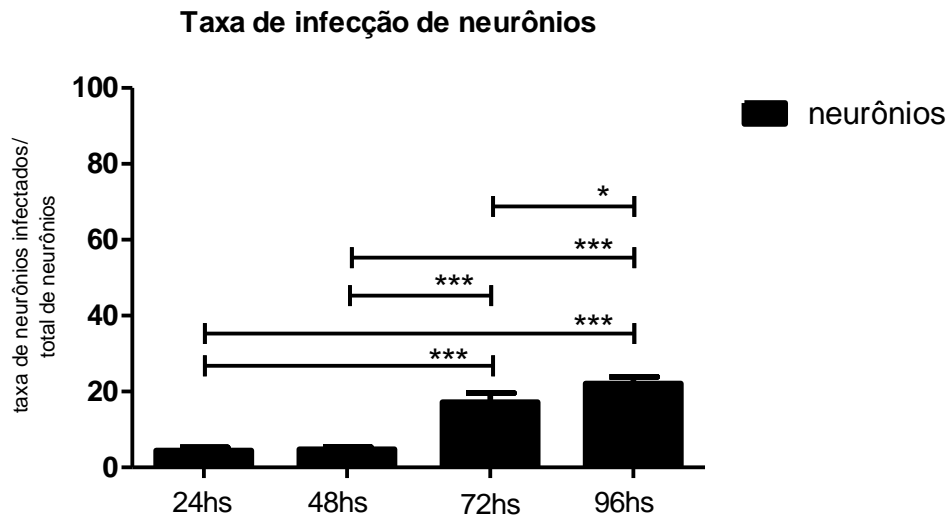


### 4.3. Cinética da taxa de infecção em culturas

Visando analisar a infecção nas células da cultura propusemos um experimento de cinética ao longo dos tempos experimentais de 24, 48, 72 e 96 horas. Inicialmente estudamos a taxa de infecção nos dois tipos celulares e observamos que em células da glia ocorre um aumento significativo de células infectadas com 96 horas (Figura 10), enquanto que em neurônios o aumento da taxa de infecção é progressivo (Figura 11). Observamos também que as células da glia possuem um maior número de parasitos em seu citoplasma que os neurônios, em todos os tempos estudados (Figura 12).



**Figura 10: Taxa de infecção de células da glia em culturas primárias de neurônios com células da glia.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubados pelo restante dos tempos experimentais de 24, 48, 72 e 96 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram coradas com Gaffney's one-hour Giemsa e em cada uma delas 300 células foram contadas e diferenciadas entre célula da glia não infectada, célula da glia infectada, neurônio não-infectado e neurônio infectado. One-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls. \*\* $p < 0,001$  comparando células da glia, representativo de três experimentos independentes,  $n=9$ .



**Figura 11: Taxa de infecção de neurônios nas culturas primárias de neurônios com células da glia.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubados pelo restante dos tempos experimentais de 24, 48, 72 e 96 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram coradas com Gaffney's one-hour Giemsa e em cada uma delas 300 células foram contadas e diferenciadas entre célula da glia não infectada, célula da glia infectada, neurônio não-infectado e neurônio infectado. One-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls. \* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,0001$  comparando neurônios, representativo de três experimentos independentes,  $n=9$ .

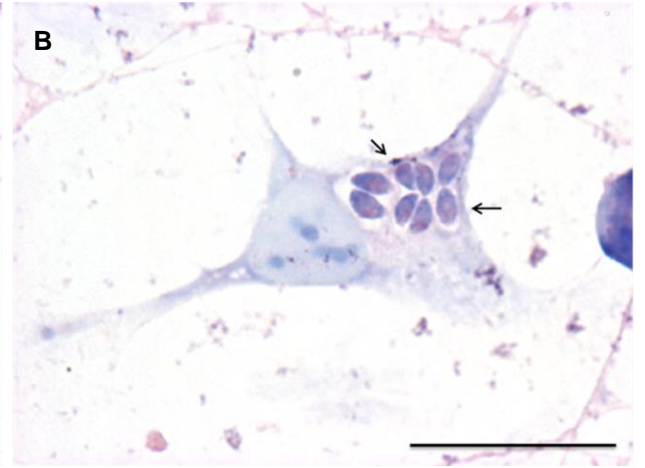
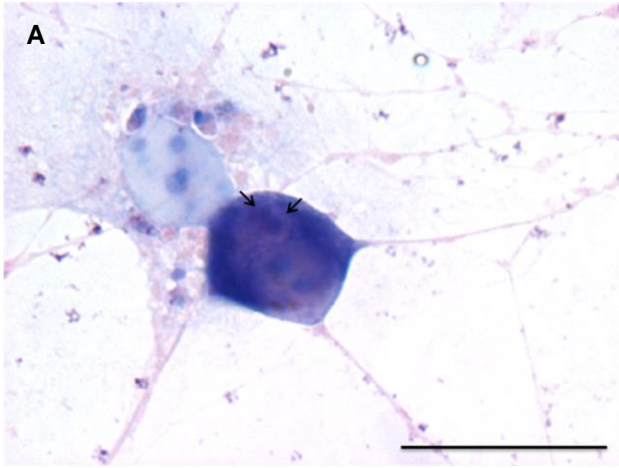


**Figura 12: Coloração de Giemsa das culturas primárias de neurônios com células da glia infectados.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubação nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram coradas com Gaffney's one-hour Giemsa, fotografadas e analisadas. Em todos os tempos de infecção observamos neurônios (**A, C, E e G**) e células da glia (**B, D, F e H**) infectados, sendo que as células da glia sempre abrigam mais parasitos que os neurônios. As setas indicam o parasito dentro das células. Barra representa 50µm. Aumento de 1000X.

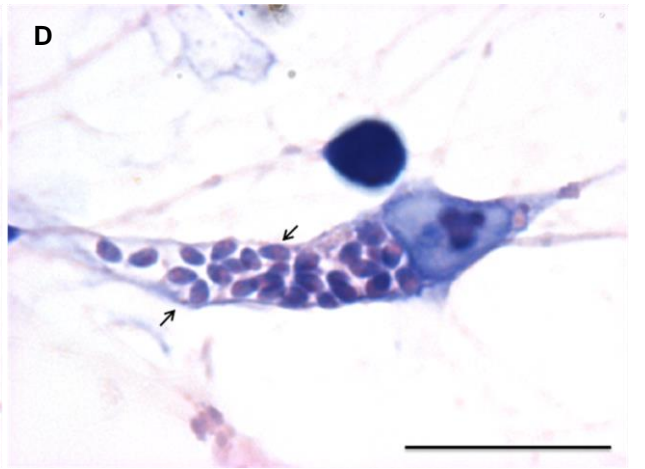
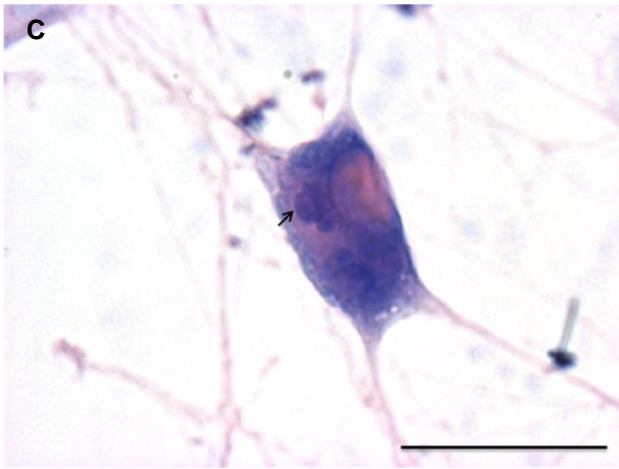
Neurônio

Célula da glia

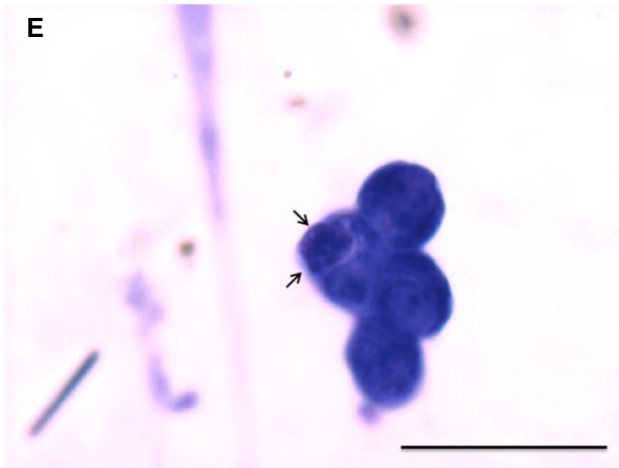
24h



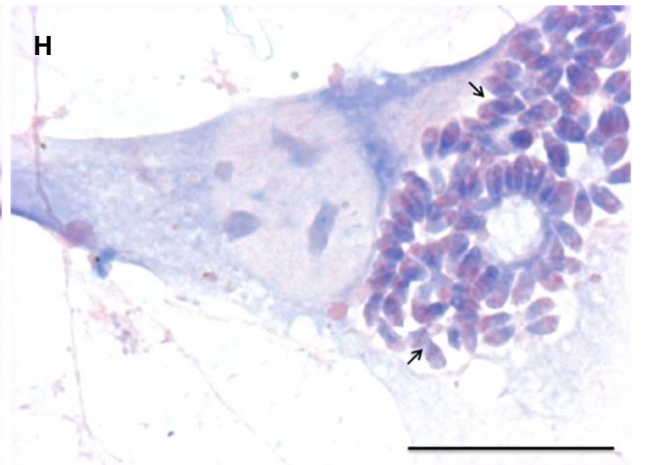
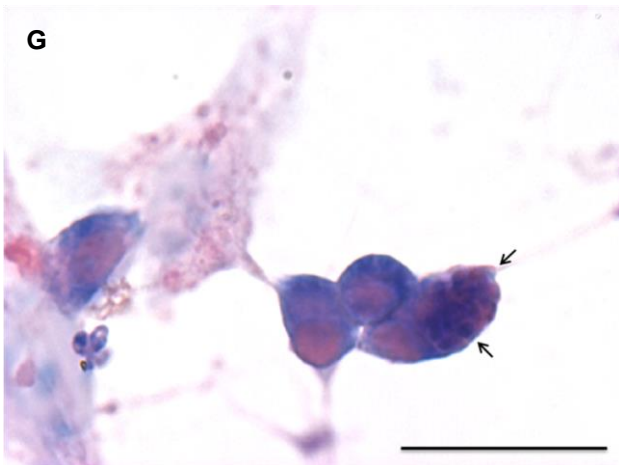
48h



72h



96h



#### **4.4. Cinética da taxa de diferenciação em bradizoítos**

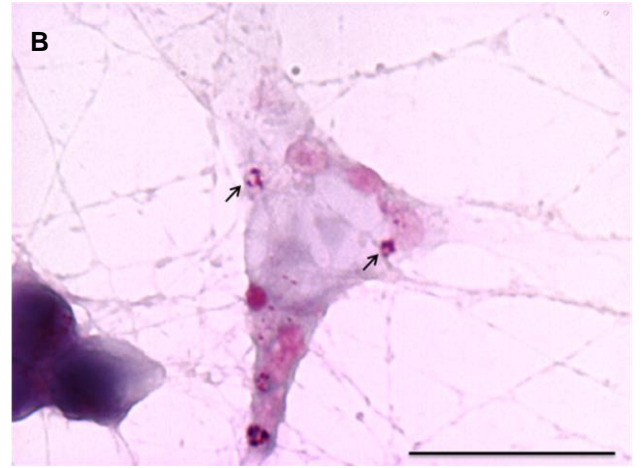
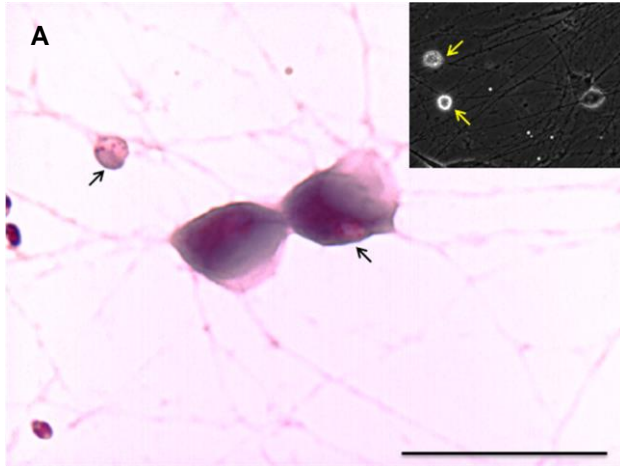
Em todos os tempos de infecção, 24, 48, 72 e 96 horas, observamos a presença de parasitos corados em púrpura pelo PAS no citoplasma de neurônios e células da glia (Figura 13) e o número de células parasitadas, intensamente coradas pelo PAS, indicando prováveis bradizoítos, aumentou ao longo do tempo nos dois tipos celulares (Figura 14 e 15).

**Figura 13: Coloração de PAS das culturas primárias de neurônios com células da glia infectados.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubados pelo restante dos tempos experimentais de 24, 48, 72 e 96 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram coradas com Ácido periódico de Schiff, fotografadas e analisadas. Em todos os tempos de infecção observamos neurônios (**A, C, E e G**) e células da glia (**B, D, F e H**) infectados. Em **A** podemos observar na imagem e no insert de campo claro, neuritos dilatados devido à presença do parasito. As setas indicam o parasito dentro das células. Barra representa 50µm. Aumento de 1000X. Insert aumento de 100X.

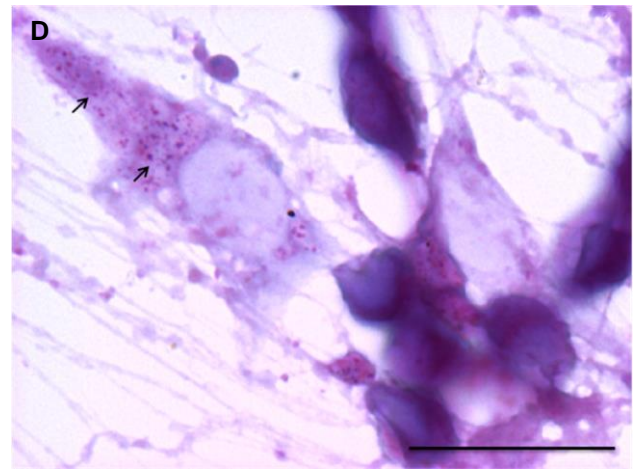
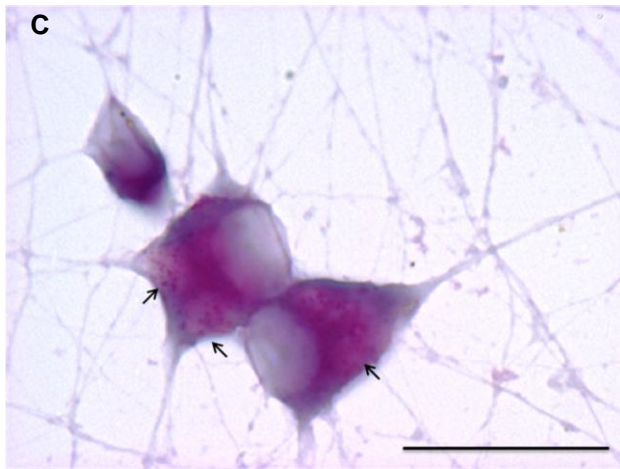
Neurônio

Célula da glia

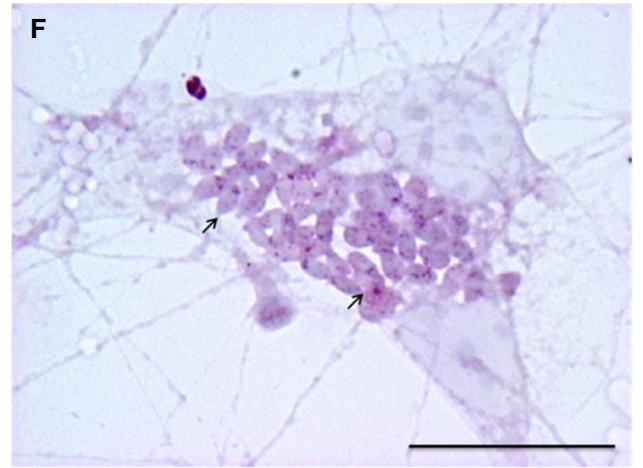
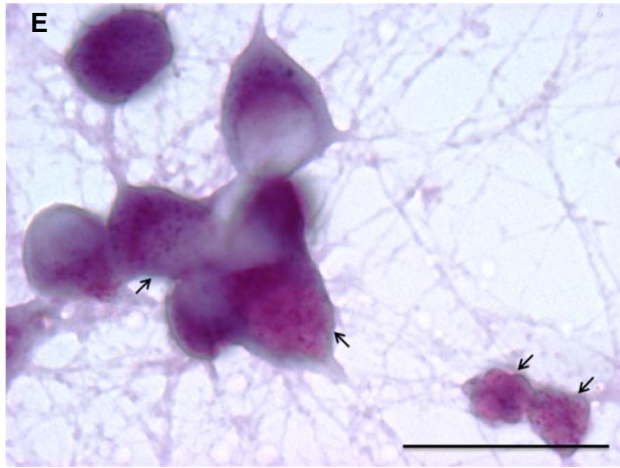
24h



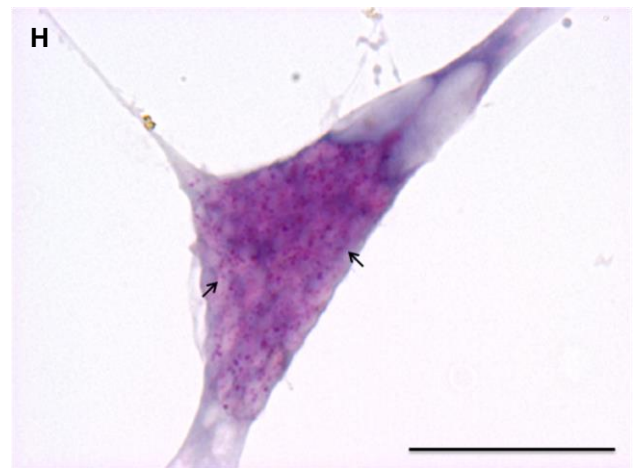
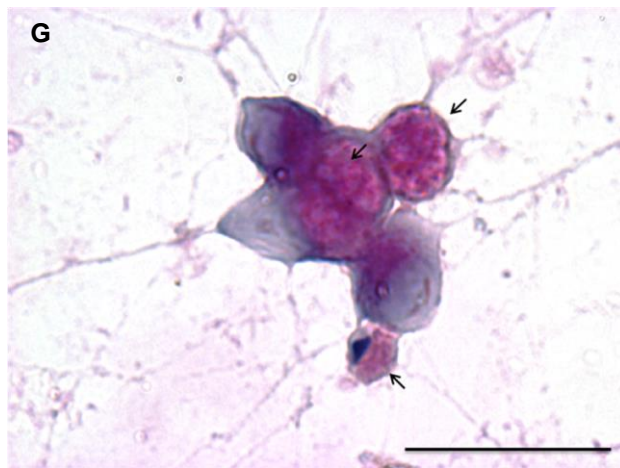
48h

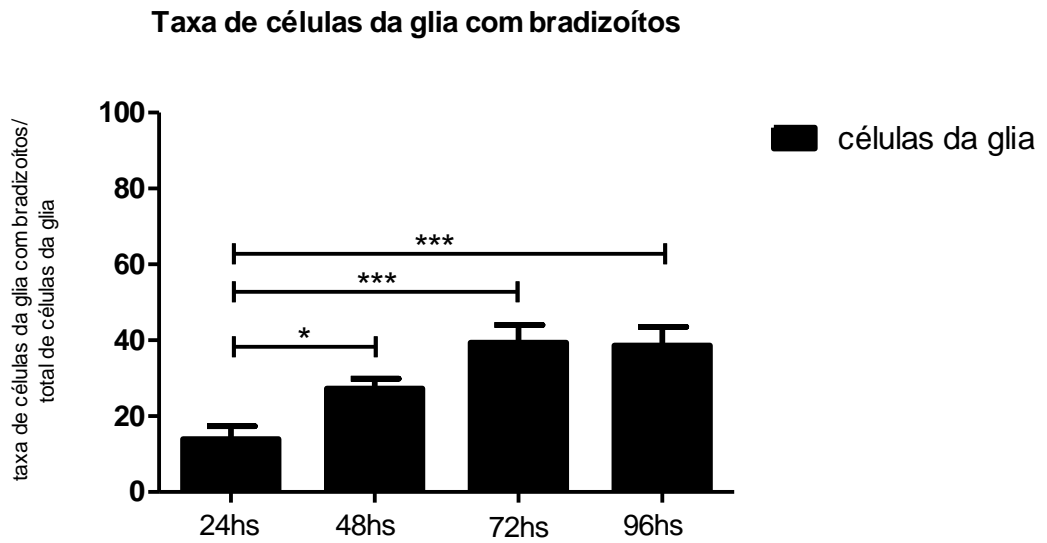


72h



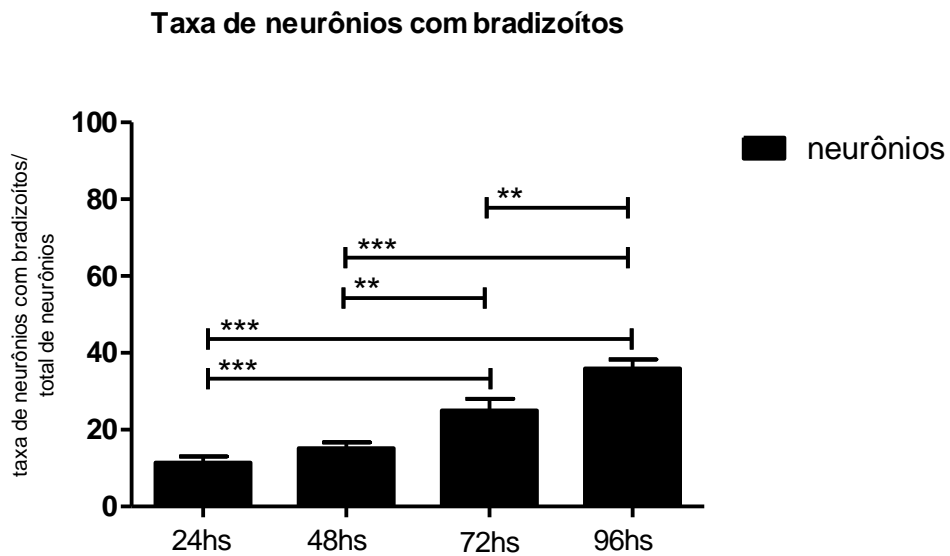
96h





**Figura 14: Taxa de diferenciação em células da glia de taquizoítos em bradizoítos nas culturas primárias.**

Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubação nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram coradas com Ácido periódico de Schiff e em cada uma delas 300 células foram contadas e diferenciadas entre célula da glia não infectada, célula da glia infectada, neurônio não-infectado e neurônio infectado. One-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls. \*\* $p < 0,001$  comparando células da glia, representativo de três experimentos independentes,  $n=9$ .

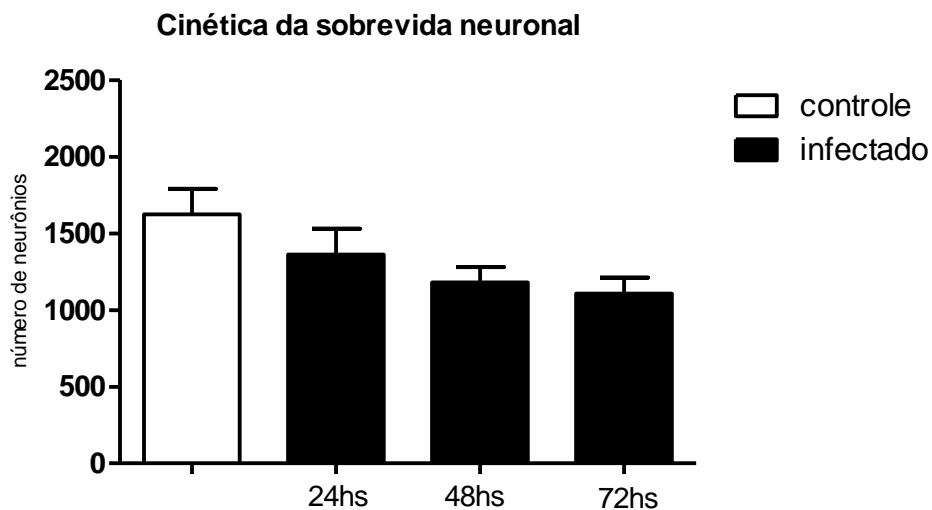


**Figura 15: Taxa de diferenciação em neurônios de taquizoítos em bradizoítos nas culturas primárias.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubação nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram coradas com Ácido periódico de Schiff e em cada uma delas 300 células foram contadas e diferenciadas entre célula da glia não infectada, célula da glia infectada, neurônio não-infectado e neurônio infectado. One-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls. \* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,0001$  comparando neurônios, representativo de três experimentos independentes,  $n=9$ .

#### 4.5. Cinética da sobrevida neuronal

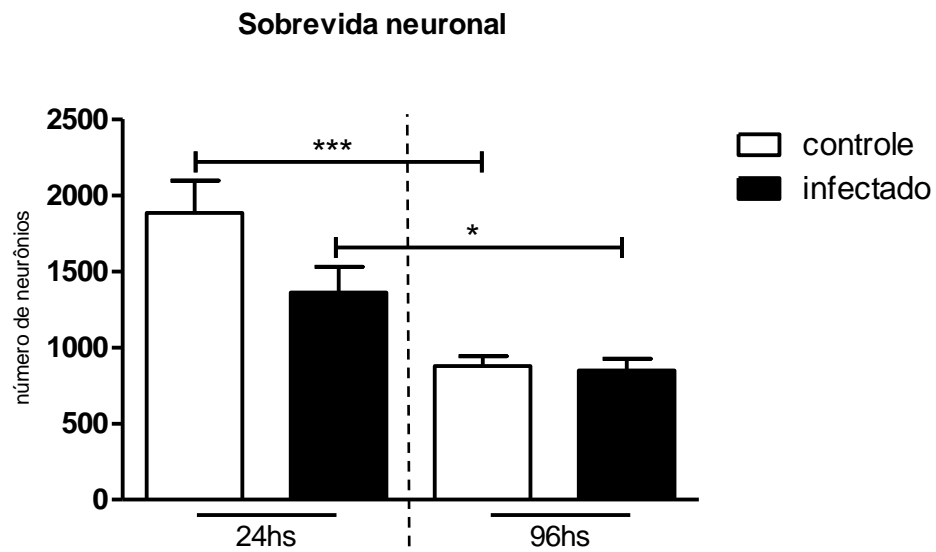
Buscando avaliar se a presença do parasito leva à morte neuronal, analisamos a sobrevida neuronal nos tempos experimentais. Entre os tempos de 24, 48 e 72 horas não observamos diferença estatística entre os controles, sendo assim foi possível fazer a comparação entre os grupos. O controle escolhido foi do tempo de 48 horas, intermediário entre os tempos avaliados. A avaliação dos grupos infectados com relação ao controle também não apresentou diferença estatística (Figura 16).

Ao analisarmos os tempos de 24 e 96 horas a morte neuronal é observada com 96 horas em ambos os grupos, controle e infectado, sendo então independente da presença do parasito (Figura 17).



**Figura 16: Número de corpos neuronais das culturas primárias de neurônios com glia.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubados pelo restante dos tempos experimentais de 24, 48 e 72 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram fotografadas em microscópio invertido e feita a contagem. One-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls. Representativo de três experimentos independentes, n=9.

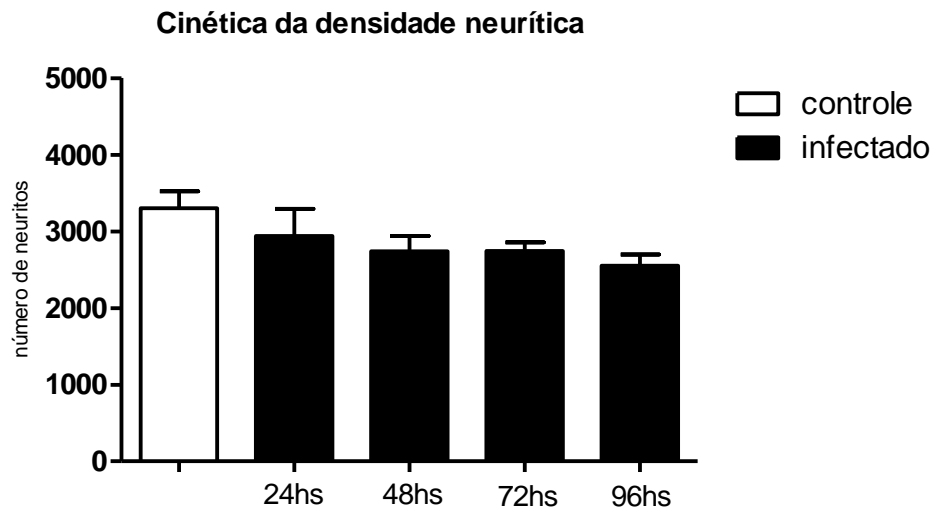




**Figura 17: Número de corpos neuronais das culturas primárias de 24 e 96 horas.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubados pelo restante dos tempos experimentais de 24 e 96 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram fotografadas em microscópio invertido e feita a contagem. One-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls. \*  $p < 0,01$  comparação de culturas 1:10, representativo de três experimentos independentes,  $n=9$ .

#### 4.6. Cinética da densidade neurítica

Buscando avaliar a existência de dano neuronal, mesmo sem observar morte pela presença do parasito nos analisamos a densidade neurítica e nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. O controle escolhido foi do tempo de 48 horas, intermediário entre os tempos avaliados. A avaliação dos grupos infectados com relação ao controle não apresentou diferença estatística (Figura 18).



**Figura 18: Densidade neurítica das culturas primárias de neurônios com glia.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubados pelo restante dos tempos experimentais de 24, 48, 72 e 96 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram fotografadas em microscópio invertido e feita a contagem. One-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls. Resultado representativo de três experimentos independentes, n=9.

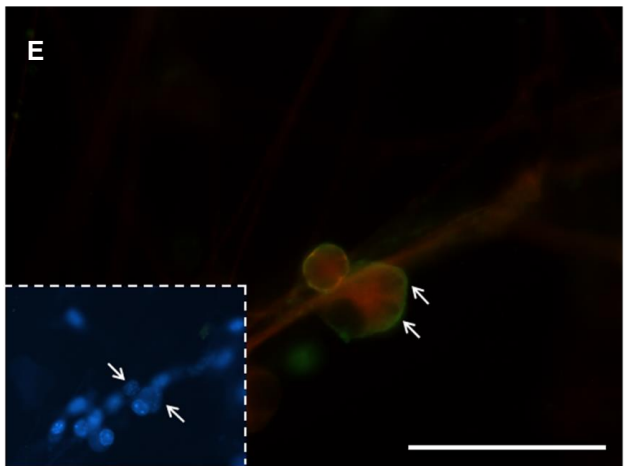
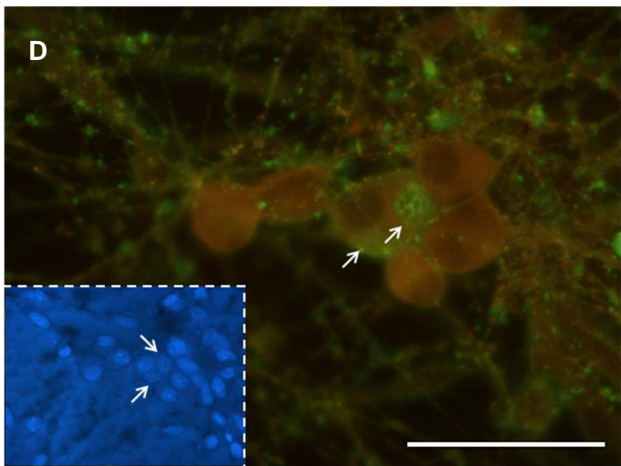
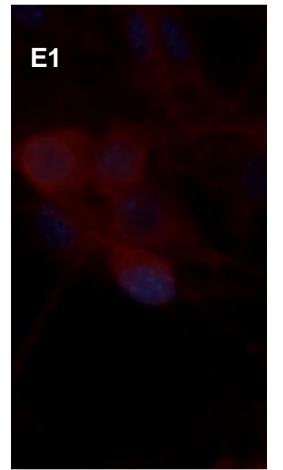
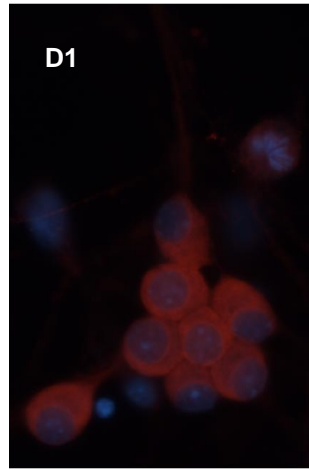
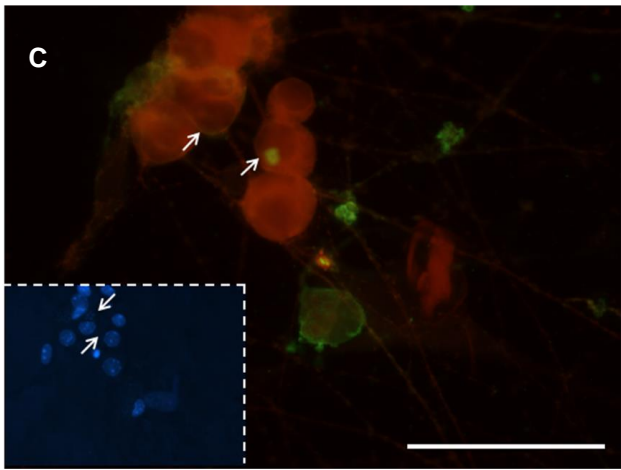
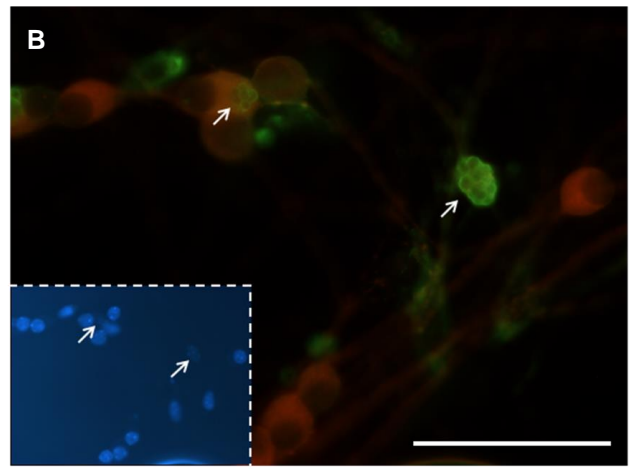
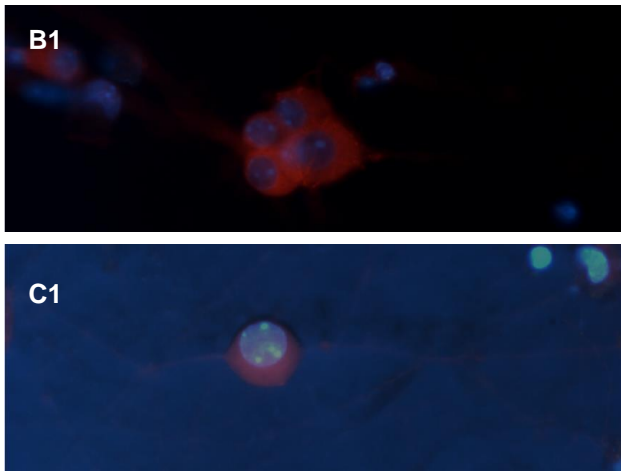
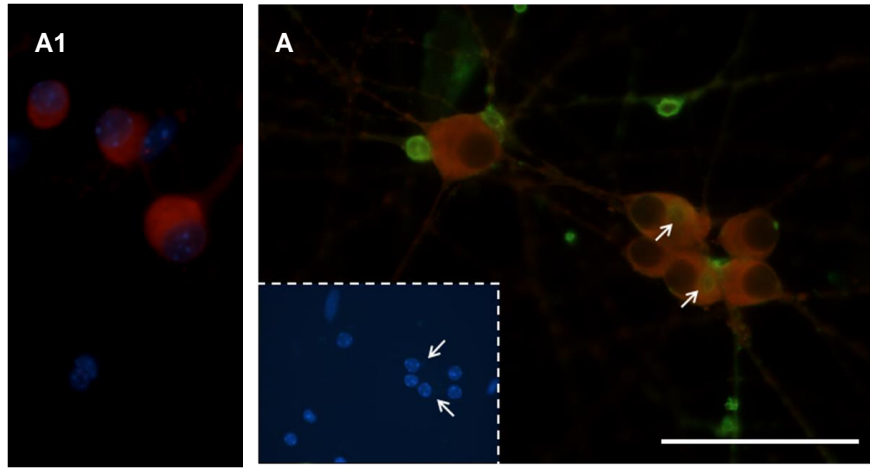
#### **4.7. Avaliação da cinética da interação parasito/hospedeiro por imunomarcadores**

##### **4.7.1. Ocorre reorganização do citoesqueleto de neurônios**

Walker e colaboradores, 2008, demonstraram em células HFF que a cepa RH, virulenta de *T. gondii* é capaz de sequestrar o centrossomo da célula para a periferia do vacúolo parasitóforo, assim facilitando o recrutamento de nutrientes (Walker, Hjort et al. 2008). Nós então nos perguntamos se o mesmo estaria acontecendo nos neurônios do GCS.

Em todos os tempos estudados observamos reorganização do citoesqueleto de neurônios por imunomarcção para  $\beta$ -tubulina (isoforma III). A maior intensidade de expressão desse marcador estava sempre ao redor dos parasitos (Figura 19).

**Figura 19: Imunomarcção de taquizoítos e do citoesqueleto de neurônios.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubação nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 192 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram marcadas com anti-toxo (verde) e anti- $\beta$ -tubulina (vermelho), fotografadas e analisadas. **A1, B1, C1, D1 e E1** representam culturas controle de 24, 48, 72, 96 e 192 horas, respectivamente. Nessas imagens observamos marcação intensa e uniforme para  $\beta$ -tubulina em todo o corpo celular dos neurônios. Em todos os tempos de infecção, **A, B, C, D e E**, observamos parasitos imunomarcados por anti-toxo e que ao redor desses parasitos ocorre reorganização do citoesqueleto dos neurônios (setas). Os núcleos das células e dos parasitos (setas do insert) foram evidenciados pelo marcador Hoechst (azul). Barra representa 100 $\mu$ m. Aumento de 400X.

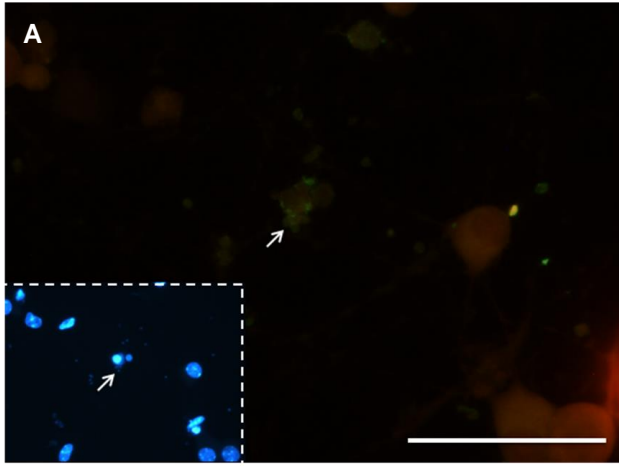


#### **4.7.2. Com 24 horas observamos início da diferenciação espontânea de alguns taquizoítos em bradizoítos**

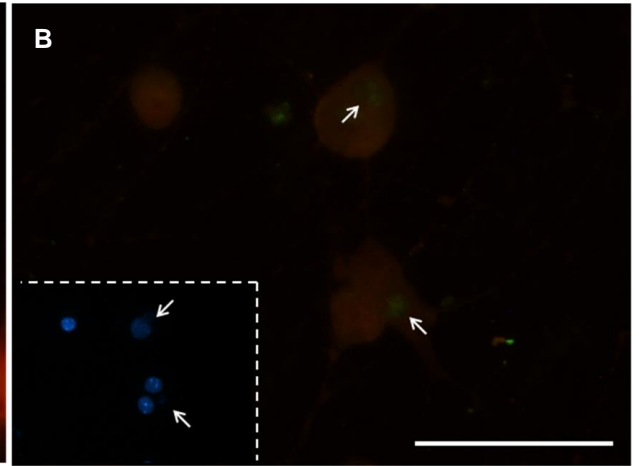
O marcador específico de bradizoítos, BAG, foi utilizado para estudar a cinética de diferenciação de taquizoítos em bradizoítos na cultura. Observamos em todos os tempos a diferenciação espontânea de taquizoítos em bradizoítos dentro de neurônios e células da glia (Figura 20).

**Figura 20: Imunomarcção de bradizoítos.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubação nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 192 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram marcadas com anti-BAG (verde) e anti-NeuN (vermelho), fotografadas e analisadas. Em todos os tempos de infecção observamos parasitos imunomarcados por BAG. Inicialmente a marcação é menos intensa e em poucos parasitos, **A** e **B**, mas aumentam em intensidade e número de parasitos ao longo do tempo de infecção, **C**, **D** e **E**. Os núcleos das células e dos parasitos (setas) foram evidenciados pelo marcador Hoechst (azul). Barra representa 100µm. Aumento de 400X.

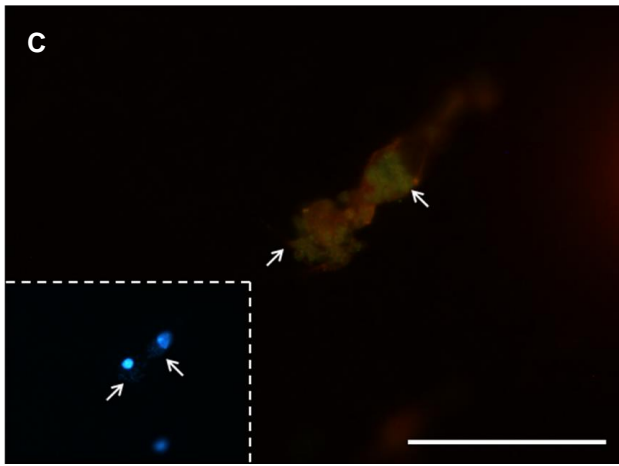
24 horas



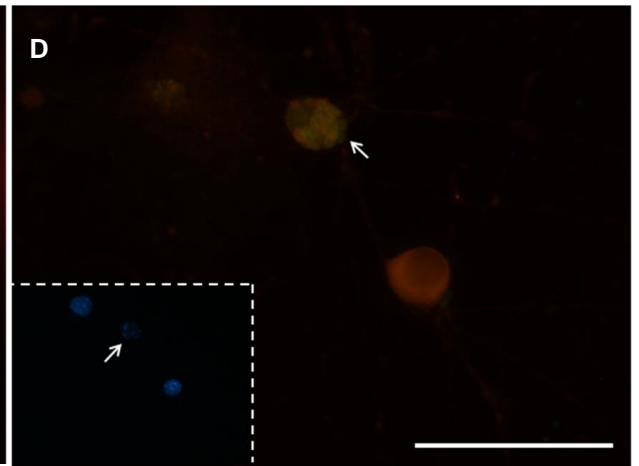
48 horas



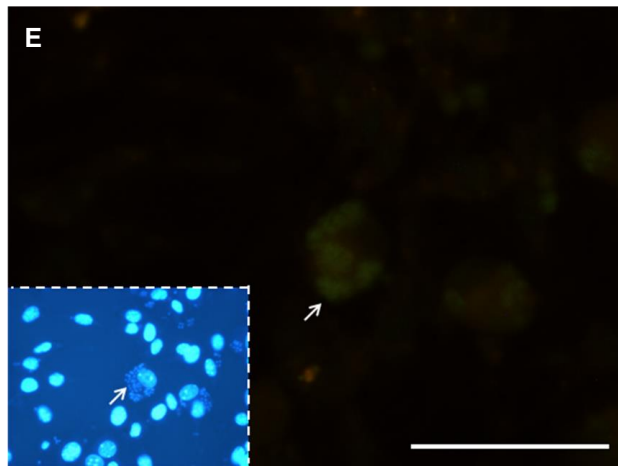
72 horas



96 horas



192 horas

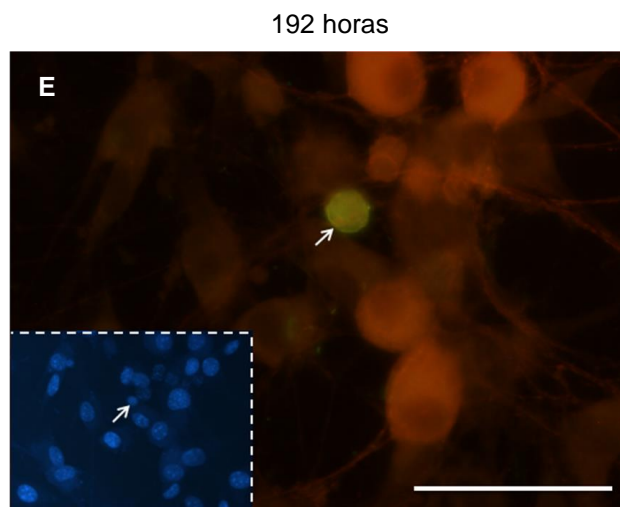
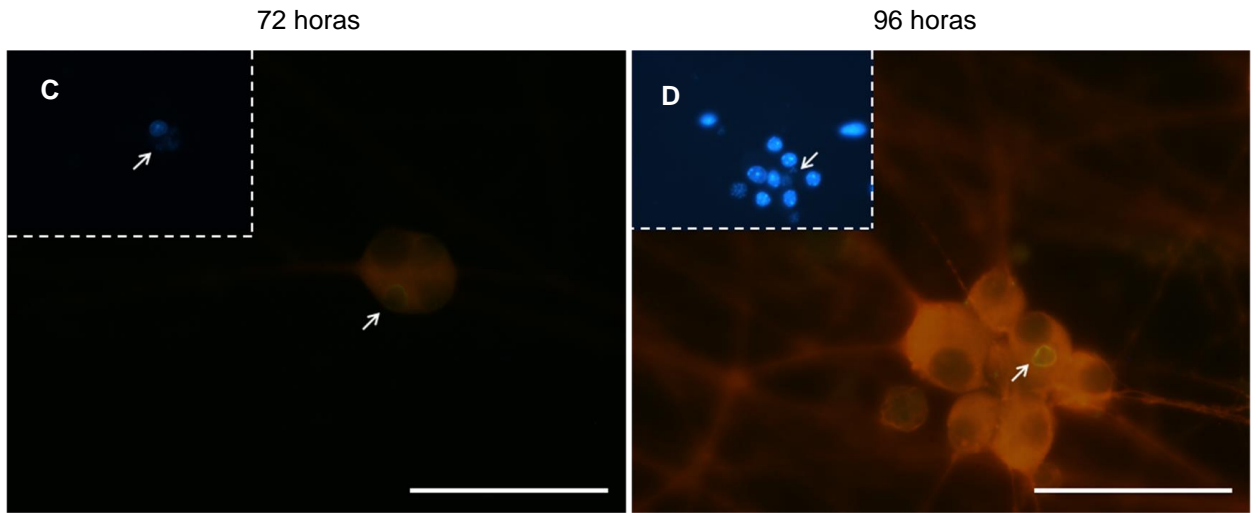
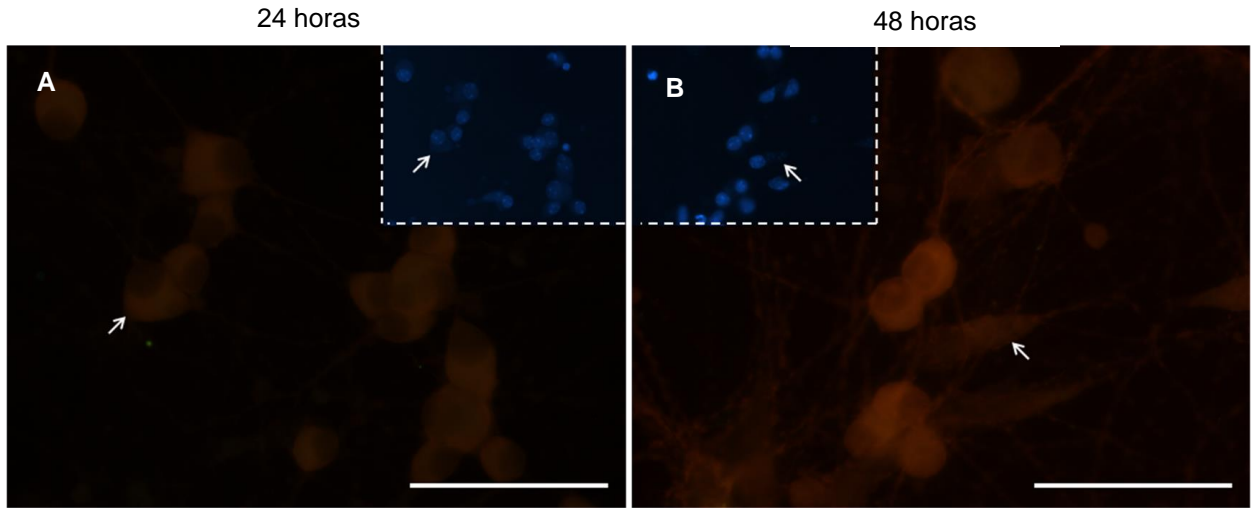




**4.7.3. Com 72 horas começamos a observar deposição de elementos da parede do cisto**

Inicialmente as culturas infectadas foram imunomarcadas com DBA para analisar o encistamento que começou a ser observado nas culturas de 72 horas, com formação completa da parede do cisto presente em culturas de 192 horas (Figura 21).

**Figura 21: Imunomarcção da parede dos cistos.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubação nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 192 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram marcadas com DBA (verde) e anti- $\beta$ -tubulina (vermelho), fotografadas e analisadas. Em **A** e **B**, culturas infectadas de 24 e 48 horas, respectivamente, não observamos marcação para DBA. Com 72 horas, **C**, observamos o início da deposição de matérias da parede do cisto em neurônios (setas) que continua com 96 horas, **D**. Com 192 horas, **E**, observamos um cisto completo. Os núcleos das células e dos parasitos (setas) foram evidenciados pelo marcador Hoechst (azul). Barra representa 100 $\mu$ m. Aumento de 400X.



#### **4.7.4. Ocorre diminuição qualitativa da expressão de tirosina hidroxilase ao longo do tempo em culturas infectadas**

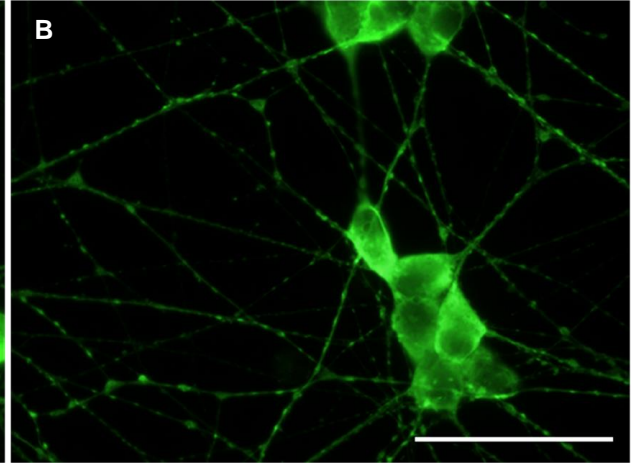
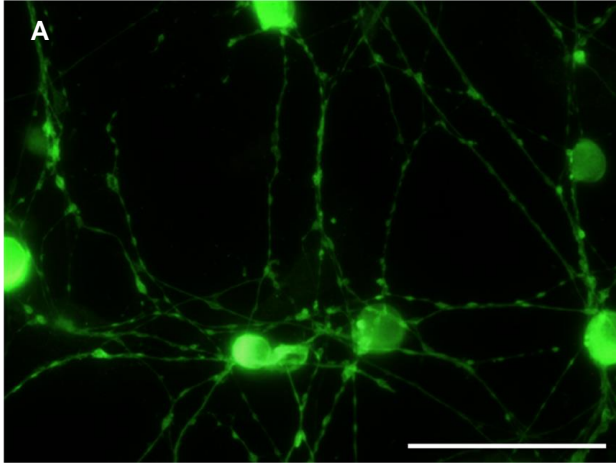
Para avaliar o metabolismo neuronal as células foram marcadas com tirosina hidroxilase e nós observamos que ao longo do tempo de cultura, nas células infectadas, ocorre diminuição qualitativa, não mensurada, da expressão dessa enzima (Figura 22).

**Figura 22: Imunomarcção para tirosina hidroxilase.** Os neurônios retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubação nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Após fixação em solução de formol tamponado a 10% as lamínulas foram marcadas com anti-tirosina hidroxilase (verde), fotografadas e analisadas. **A, C, E e G** representam culturas controle de 24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente, mostrando corpos celulares, neurítos e varicosidades expressando tirosina hidroxilase. Na cultura infectada de 72 horas, **F**, observamos menor marcação para tirosina hidroxilase e essa diminuição se torna mais evidente com 96 horas, **H**. Em **F** também podemos observar neuritos repletos de parasitos (seta). Os núcleos dos parasitos foram evidenciados pelo marcador Hoechst (azul). Barra representa 100µm. Aumento de 400X.

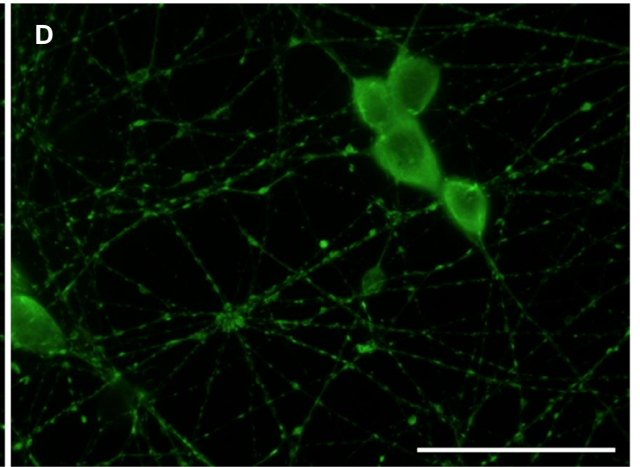
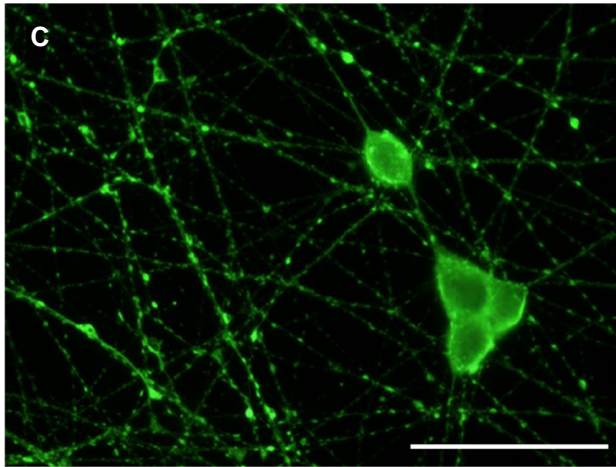
Controle

Infectado 1:10

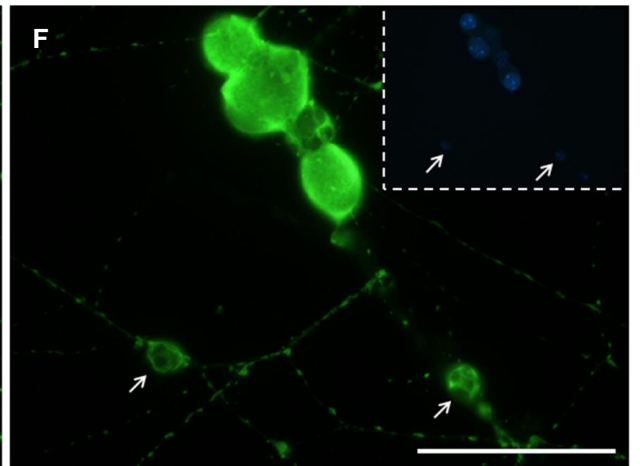
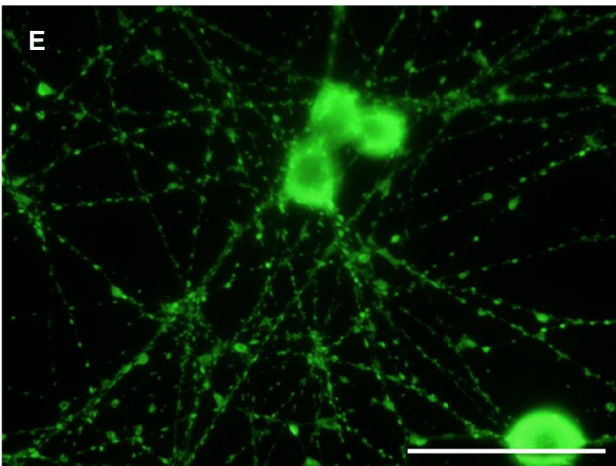
24h



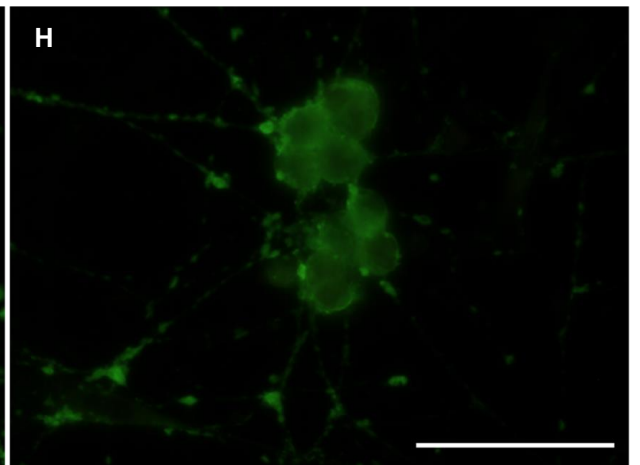
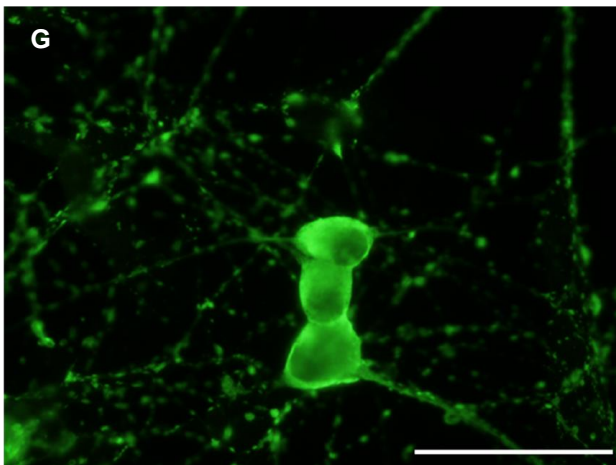
48h



72h



96h



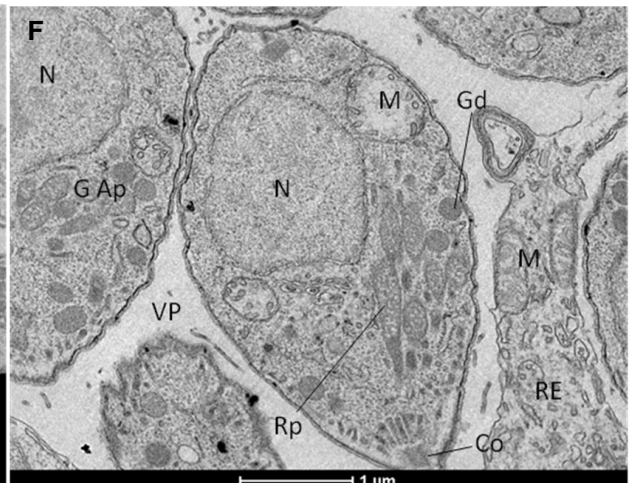
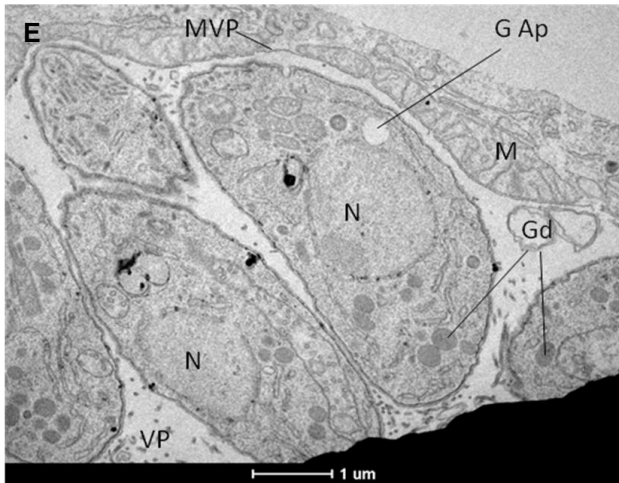
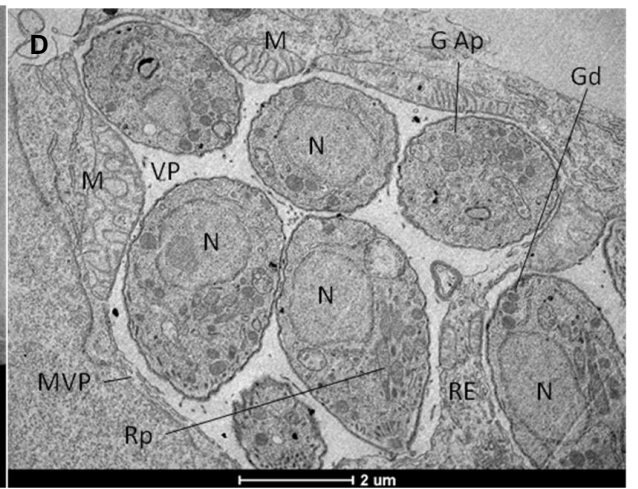
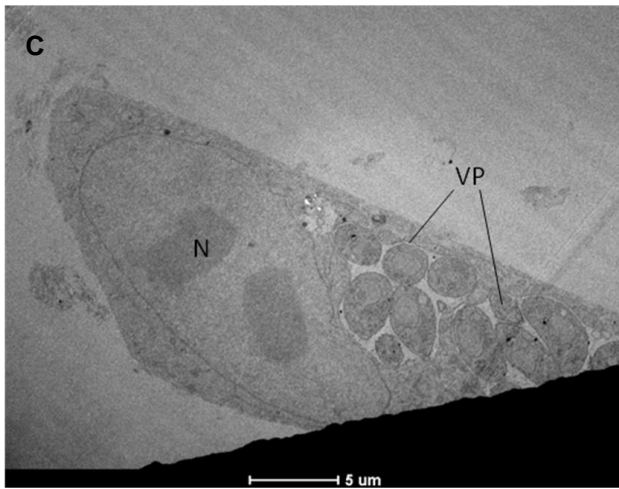
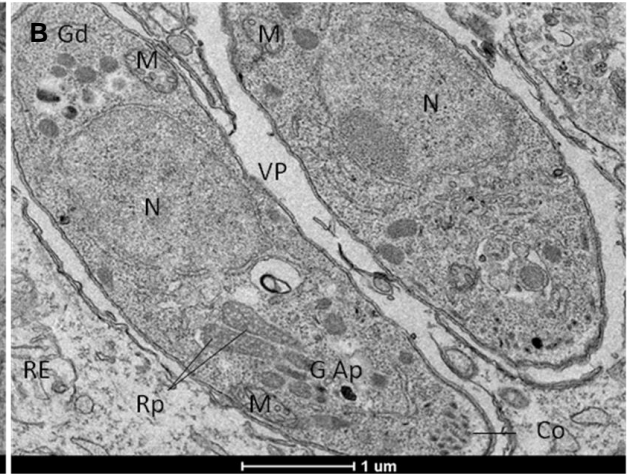
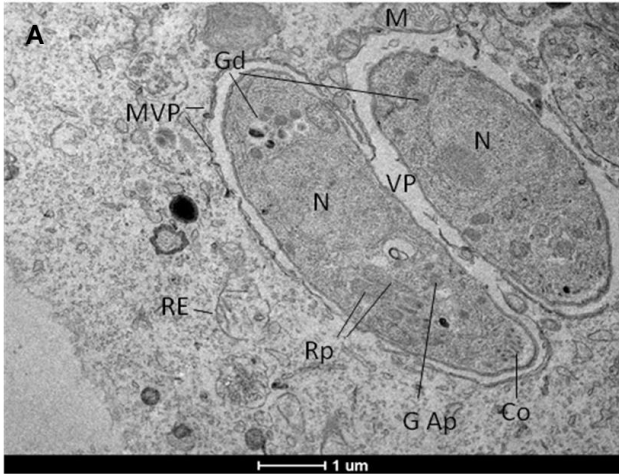
#### **4.8. Observação ultraestrutural do parasito em células da glia**

A análise ultraestrutural das culturas revelou células da glia repletas de parasitos em seu citoplasma com 72 horas após infecção. Os parasitos estavam envoltos por uma membrana fina e rodeada por estruturas túbulo vesiculares e mitocôndrias da célula hospedeira, que formam a parede do vacúolo parasitóforo. Os parasitos tinham a forma de crescentes com núcleo posicionado em diversas regiões do citoplasma do parasito, porém pelas organelas presentes e sua organização, caracterizamos os parasitos como taquizoítos. Apesar da presença dos parasitos, as células da glia não apresentaram sinais de degeneração (Figura 23).

Em outros tempos e outras preparações temos evidência da presença de parasitos no citoplasma de neurônios, mas artefatos da preparação nos impediram, neste momento, de observar detalhes ultraestruturais.

**Figura 23: Microscopia eletrônica de transmissão de células da glia.** Os neurônios e células da glia retirados do GCS foram dissociados e plaqueados na presença de matrigel, meio completo e NGF por 24 horas, seguida de infecção 1:10, célula/parasito, por 3 horas com a cepa TgCTBr9 de *T. gondii* e incubados pelo restante do tempo experimental de 72 horas. Após fixação com glutaraldeído em tampão cacodilato as lamínulas foram levadas ao Centro de Microscopia da UFMG para processamento e análise. As imagens apresentam células da glia infectadas pelo parasito. Em **B**, (detalhe de **A**) e **D**, **E** e **F** (detalhe de **C**) é possível observar maiores detalhes dos parasitos e da membrana que os recobre. (**N**) núcleo, (**M**), mitocôndria, (**MVP**) membrana do vacúolo parasitóforo, (**Gd**) grânulos densos, (**VP**) vacúolo parasitóforo, (**RE**) retículo endoplasmático, (**Rp**) róprias, (**Co**) conóide, (**G Ap**) grânulos de amilopectina.





## 5. DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou pela primeira vez a interação de uma cepa de genótipo atípico de *T. gondii* (TgCTBr9) isolada de humano, com neurônios e células da glia do sistema nervoso periférico em cultura primária. Observamos a invasão celular, pela presença intracelular do parasito. A replicação foi atestada, pela presença de rosetas, e a diferenciação, pela expressão de antígenos da parede de bradizoítos. Já o encistamento, foi documentado pela ligação do DBA com a *N*-acetil-galactosamina, expressa na parede de cistos.

Como nosso estudo com a cepa TgCTBr9 é inédito, nós inicialmente padronizamos a taxa de infecção *in vitro*. Para tanto foram testados os MOIs de 1:5 e 1:10, como estudado por Paredes-Santos, 2013 (Paredes-Santos, Martins-Duarte et al. 2013). Contudo não observamos diferença estatística entre essas taxas e padronizamos a taxa de 1:10 para garantir a infecção das células estudadas. Suss-Toby e colaboradores, 1996, estudando fibroblastos, Schluter e colaboradores, 2001, estudando neurônios do cerebelo e Contreras-Ochoa e colaboradores, 2013, estudando astrócitos, também utilizaram a taxa de 1:10 considerada a mais eficaz para a infecção de suas culturas (Suss-Toby, Zimmerberg et al. 1996; Schluter, Deckert et al. 2001; Contreras-Ochoa, Lagunas-Martinez et al. 2013).

A partir da taxa de infecção padronizada, nós nos concentramos na cinética da interação parasito/célula hospedeira. O estudo da cinética envolveu análises morfológicas, de sobrevivência e de taxas de infecção. Ao realizarmos a análise morfológica de nossas culturas primárias, observamos que as culturas infectadas apresentaram alterações morfológicas discretas, apesar de observarmos infecção maciça no citoplasma das células em cultura, sejam elas neurônios ou células da glia. Essas alterações são representadas por morte celular em ambos os tipos celulares de forma não possível de discriminar nesta preparação, e é evidenciada pelo encolhimento. O parasitismo exacerbado foi observado pelo aumento de volume das células, conforme figura 9.

Não foi possível correlacionar a morte celular com a presença do parasito em nenhum dos tempos examinados, a despeito de uma progressiva taxa de infecção ao longo das 96 horas estudadas. Culturas primárias de neurônio após o plaqueamento, quando mantidas por mais de 24 horas, apresentam algum grau de morte celular progressiva independentemente de estímulos (Arantes, Lourenssen et al. 2000). Nossas culturas foram infectadas 24 horas após o plaqueamento, de forma que com 96 horas após infecção as culturas apresentavam 120 horas,

tendo sido submetidos a diversos procedimentos de lavagem e troca de meio, o que pode explicar a diminuição considerável de células neste tempo em relação aos primeiros tempos de experimento. Esse mesmo fenômeno já foi observado por nosso grupo (Arantes, Lourenssen et al. 2000). Uma vez que nossos controles são intra-experimentais tal fato não afeta a observação de sobrevivência neuronal preservada nas culturas infectadas. Desta forma, podemos afirmar que o parasito não induziu dano suficiente para interferir com as contagens celulares que pode ser comprovado nos experimentos controle de 96 horas.

Assim como no nosso estudo, Barbosa e colaboradores, 2009 e Papazian-Cabanas e colaboradores, 2011, que estudaram toxoplasmose em neurônios mioentéricos do sistema nervoso periférico (SNP) de camundongos, através de análises morfométricas, não encontraram alterações estatisticamente significativas quanto à análise quantitativa dos neurônios entéricos. Contudo, esses autores demonstraram redução na relação da área do corpo celular com o núcleo dos neurônios mioentéricos de animais infectados (Barbosa, Araújo et al. 2009; Papazian-Cabanas, Araújo et al. 2012). Diferente do nosso trabalho, esses autores não relataram a presença de neurônios infectados pelo parasito. É importante salientar que o nosso modelo de estudo facilita a detecção de alterações neuronais em comparação com o método de estudo de neurônios mioentéricos *in vivo* (Barbosa, Araújo et al. 2009; Papazian-Cabanas, Araújo et al. 2012). Nós conseguimos demonstrar que apesar da ausência de morte neuronal, com 96 horas é possível observar neurônios intactos, neurônios infectados e certo grau de dano neuronal, observado por encolhimento ou aumento do volume celular. Nash e colaboradores, 1998, mostraram que células infectadas com *T. gondii* são resistentes a múltiplos indutores de apoptose, incluindo vias Fas-dependente e Fas-independente, deprivação de IL-2 e irradiação gama e ultravioleta. A inibição de tantos indutores de apoptose sugere que um mecanismo comum a todos esteja envolvido. A atividade inibitória relatada por esses autores requer parasitos intracelulares vivos e contínua síntese proteica (Nash, Purner et al. 1998). Apesar da inibição de fragmentação de DNA mediada por *T. gondii*, células infectadas podem ser lisadas por CTL (células T citotóxicas) (Nash, Purner et al. 1998). Kim e colaboradores, 2006, relataram que o parasito é capaz de inibir (Butcher, Kim et al. 2001) ou aumentar (Kim, Ahn et al. 2006) a expressão de NF- $\kappa$ B em células infectadas, interferindo na ocorrência de apoptose das mesmas (Butcher, Kim et al. 2001). Recentemente, estudos *in vivo* de animais cronicamente infectados utilizando técnicas de imagem em três dimensões mostraram neurônios intactos apesar da presença do parasito

(Koshy and Cabral 2014). É possível que os mecanismos de proteção celular estejam ocorrendo em nossas culturas, mas estudos mais aprofundados ainda são necessários.

Uma vez que não encontramos morte celular em nenhum dos tempos estudados, nos voltamos para o estudo dos neuritos, que são estruturas mais delicadas e que se mostraram infectadas pelo parasito. O estudo da lesão causada pela interação parasito/hospedeiro em neurônios leva em consideração que a sobrevivência dos neurônios está relacionada à capacidade dos mesmos de manter, perder e restaurar seu potencial elétrico em sucessões rápidas (Hutchins and Barger 1998). Além disso, a perda de neuritos tem consequências devastadoras para a comunicação intra neuronal e sobrevivência dos mesmos (Hutchins and Barger 1998). Sendo assim, qualquer discussão sobre a neuropatologia deve considerar o potencial de danos em estruturas neuronais, mesmo quando a contagem de corpos celulares não detecta morte (Hutchins and Barger 1998). Na nossa análise qualitativa da densidade neurítica através de microscopia de campo claro, foi encontrada uma tendência de diminuição ao longo do tempo de infecção. Porém, a análise estatística não refletiu esse fato. Isso pode ter ocorrido por falhas no nosso método de contagem, ou amostragem, embora três triplicatas tenham sido analisadas em cada tempo estudado. Este mesmo método de quantificação neurítica já foi utilizado por Arantes e colaboradores, 2000, e detectou lesão neurítica em presença de discreto dano neuronal (Arantes, Lourenssen et al. 2000). Pan e colaboradores, 2014, estudando lesões na coluna espinhal de camundongos, utilizaram a marcação por tirosina hidroxilase (TH) para evidenciar neuritos e assim realizar as análises necessárias (Pan, Shen et al. 2014). Em nosso caso, a repetição dos experimentos necessários para realizar a quantificação por esse método foi limitada pelo número de células obtidas por experimento. Dessa forma, embora também tenhamos estudado a expressão de TH nós não realizamos quantificações da densidade neurítica dessa maneira. Nossa análise foi feita talvez sem uma distinção precisa entre neuritos e prolongamentos da glia, e isso deve ter influenciado o fato de não encontrarmos diminuição da densidade, mesmo com a presença do parasito. Outro fato a considerar, é que o parasito pode estar utilizando de algum mecanismo para manter a estabilidade do neurito infectado, preservando assim a sua própria existência.

Creuzet e colaboradores, 1998, analisaram culturas de neurônios do hipocampo de ratos, mas não encontraram replicação de parasitos dentro dessas células (Creuzet, Robert et al. 1998). Em nosso estudo nós não somente observamos a capacidade de replicação de parasitos em

neurônios do gânglio cervical superior (GCS), mas também vimos que a taxa de infecção aumenta ao longo do tempo, tanto em neurônios, quanto em células da glia.

Assim como outros autores nós também encontramos uma maior taxa de células da glia infectadas do que neurônios. Como demonstrado por Creuzet e colaboradores, 1998 e Grimwood e colaboradores, 1996, a infecção das células por *Toxoplasma gondii* está relacionada com o ciclo celular da célula hospedeira, e neurônios são células que se encontram em G0, enquanto células da glia são altamente mitóticas (Grimwood, Mineo et al. 1996; Creuzet, Robert et al. 1998). Outro fator que pode estar relacionado com o parasitismo preferencial por células da glia é a expressão de algum receptor de membrana, relacionado à adesão, que estaria mais expresso nas células da glia (Staessen, Gasowski et al. 1999). Diferenças no comportamento da cepa estudada, que ainda não foram descritas, podem estar relacionadas com a preferência do tipo celular para entrada do parasito. Diversos trabalhos relatam diferentes tropismos na infecção de células do sistema nervoso central (SNC) (Fagard, Van Tan et al. 1999; Luder, Giraldo-Velasquez et al. 1999). Luder e colaboradores, 1999, estudaram a preferência de infecção de uma cepa avirulenta de *T. gondii* em diferentes células do sistema nervoso central de ratos e observaram que 10% dos neurônios e astrócitos estavam infectados, enquanto 30% de micróglia, apesar de infectadas, não permitiram a replicação (Luder, Giraldo-Velasquez et al. 1999). Já Fagard e colaboradores, 1999, estudando células do hipocampo infectadas por uma cepa virulenta detectaram que astrócitos são mais eficientemente infectados que os neurônios dessa região do cérebro (Fagard, Van Tan et al. 1999).

Além da preferência de infecção nós também observamos diferença no número de parasitos por células, sendo que células da glia continham sempre mais parasitos que os neurônios. Isso pode estar relacionado a diversos fatores, sendo um deles o tamanho celular. Neurônios podem ser até 10 vezes menores que células da glia, limitando assim, o número de parasitos intracelulares nos neurônios (Grimwood, Mineo et al. 1996; Creuzet, Robert et al. 1998). Outro fator que pode estar relacionado à limitação do número de parasitos por célula é que neurônios possuem grande controle citoesquelético; e isso levaria a um enclausuramento do parasito e assim à diminuição da taxa de multiplicação e também poderia ser um estímulo para o encistamento, que foi observado preferencialmente nos neurônios.

A avaliação da morfologia e funcionalidade dos neurônios foi realizada por marcação de  $\beta$ -tubulina e de tirosina hidroxilase respectivamente. A expressão desses marcadores foi modificada pela infecção. Estudos *in vivo* da interação de *T. gondii* com neurônios do sistema nervoso central (SNC) indicam que o parasito é capaz de alterar a organização dos neurofilamentos e microtúbulos e se rodear por esses filamentos (Walker, Hjort et al. 2008; Boyle and Radke 2009; Melzer, Cranston et al. 2010). Essa habilidade tem sido considerada um mecanismo de sobrevivência, uma vez que isola o parasito do reconhecimento e resposta da célula hospedeira (Walker, Hjort et al. 2008). Nosso grupo, pela primeira vez, descreveu a mesma estratégia em neurônios do sistema nervoso periférico (SNP) cultivados *in vitro*. Em culturas infectadas de todos os tempos encontramos reorganização de  $\beta$ -tubulina nos neurônios infectados, com maior expressão do marcador ao redor dos parasitos, mas sem grandes alterações na morfologia neuronal.

Por outro lado, nossos achados de alteração qualitativa na expressão de TH podem indicar que o parasito tem a habilidade de interferir com a produção normal de enzimas pela célula hospedeira. Romano e colaboradores, 2012, mostraram evidências de re-arranjo dos sistemas de membranas celulares, no citoplasma de células que abrigam os parasitos em seus diversos estágios. Esses autores sugerem que o metabolismo proteico e lipídico das células infectadas pode ser afetado durante a infecção uma vez que o parasito desenvolveu estratégias para recrutar elementos do reticulo endoplasmático e do aparato de golgi, interceptando o tráfico de vesículas exocíticas da célula hospedeira (Romano, de Beaumont et al. 2013). Estudos *in vitro*, relacionando essas alterações estruturais do neurônio infectado com a síntese de neurotransmissores, ou com o tráfico de vesículas sinápticas não são relatados na literatura, embora haja evidências de mudança na conectividade neuronal e na plasticidade sináptica (Parlog, Harsan et al. 2014).

Nós observamos, embora sem quantificar, que a expressão de TH diminui ao longo do tempo. Isso pode nos indicar a interferência do parasitismo tanto no processo de adaptação para a formação do cisto, como em prováveis alterações na função neuronal. Kurz e colaboradores, 1998, ao estudarem a interação de uma cepa virulenta de *T. gondii* com células neuroepiteliais e observaram com seis horas de infecção, que micróglia infectadas perdem a maioria de seus ribossomos e organelas enquanto neurônios e células da glia apresentam poucas alterações (Kurz, Bockeler et al. 1998). Apesar de suas inúmeras limitações e dificuldades de padronização, muitos autores utilizam a análise da intensidade de fluorescência como método

quantitativo para verificar a expressão de marcadores de imunofluorescência (Meyer-Luehmann, Mielke et al. 2009; Spires-Jones, de Calignon et al. 2011; Gao, Zhang et al. 2013; Pan, Shen et al. 2014), no entanto a análise da expressão do gene é o método mais indicado nos estudos com animais. Contudo, esse método se mostrou impraticável pela nossa dificuldade em obter um número suficiente de células por cultura, e optamos por uma análise interpretativa. Outras enzimas e proteínas neuronais podem estar afetadas pelo processo de encistamento da cepa TgCTBr9 porém estudos mais detalhados são necessários. Recentemente, Parlog e colaboradores, 2014, observaram que o parasito é capaz de induzir modificações na célula infectada. Como exemplo, temos a alteração do metabolismo de dopamina, o silenciamento dos neurônios, e interferência nas vias de apoptose (Parlog, Schluter et al. 2014).

Um fator de grande importância para a sobrevivência de *T. gondii*, como também para o tratamento da toxoplasmose, é o encistamento (Jacobs, Remington et al. 1960). Os medicamentos atuais não eliminam o cisto que permanecendo latente no paciente por toda a vida podendo re-agudizar e gerar consequências graves, principalmente em pessoas imunocomprometidas (Luft and Remington 1992; Carruthers and Suzuki 2007). Em nosso estudo, priorizamos um tempo maior de cultura para avaliar se há formação espontânea de cistos. Com 72 horas de infecção iniciou-se a deposição de elementos da parede do cisto que com 192 horas já estava concluído e a totalidade da parede do cisto foi facilmente observada dentro de neurônios e células da glia. Essa é a primeira vez na literatura que o processo de encistamento *in vitro* de uma cepa virulenta, humana e atípica de *T. gondii* é descrita no sistema nervoso periférico. É importante ressaltar que os estudos no SNP são em neurônios mioentéricos e o parasito não foi encontrado dentro dessas células (Sugauara, Sant'Ana Dde et al. 2008). A maioria dos grupos que estudam o encistamento utilizam algum tipo de estímulo externo, como alteração de pH e temperatura, ou adição de IFN- $\gamma$  exógeno para que ocorra encistamento (Bohne, Heesemann et al. 1994; Soete, Camus et al. 1994; Weiss, Laplace et al. 1995). Paredes-Santos e colaboradores, 2013, também demonstraram o encistamento espontâneo com a cepa EGS em células da glia imortalizadas (Paredes-Santos, Martins-Duarte et al. 2013), que embora sejam mais fáceis de trabalhar não reproduzem todas as características das células diferenciadas (Lonchamp, Dupont et al. 2006).

Em nosso trabalho a detecção de diferenciação espontânea de bradizoítos foi realizada por dois métodos amplamente descritos na literatura (Jacobs, Remington et al. 1960; Paredes-

Santos, Martins-Duarte et al. 2013). A imunofluorescência por anti-BAG é altamente específica por basear-se na detecção de imunomarcadores para a parede de bradizoítos, (Paredes-Santos, Martins-Duarte et al. 2013). Já a coloração por PAS detecta os grânulos de amilopectina presentes em grande quantidade no citoplasma dos bradizoítos (Jacobs, Remington et al. 1960). É importante lembrar que nossa análise por PAS demonstrou a presença de maior número de neurônios infectados do que a análise por Giemsa, que foi utilizada para avaliar a taxa de infecção. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que apesar da coloração por Giemsa ser um método clássico e permitir a detecção do parasito e a visualização geral das células em cultura (Zaniolo, da Silva et al. 2012), ela não apresentou alta sensibilidade quando comparado ao PAS, assim como previamente relatado por Dubey e colaboradores, 1998 (Dubey, Lindsay et al. 1998). É importante lembrar que esses parasitos marcados não necessariamente são bradizoítos maduros, mas representam que a diferenciação teve início e ocorreu de maneira espontânea desde o início da cultura.

O método de microscopia eletrônica permitiu a comprovação da presença do parasito no interior de células da glia e, em nível ultra estrutural, foi possível observar que células infectadas mantêm sua membrana íntegra e não apresentam evidências de dano celular. Como a proporção de células da glia por neurônios é maior, nossa amostragem detectou parasitas nestas células. Não foi possível documentar a presença do parasito nas estruturas axonais, como já detectado em nível óptico nos corpos celulares e nas estruturas axonais dilatadas que foram descritas neste trabalho. Nas células da glia detectamos os parasitos contendo diversas organelas características de taquizoítos. Apesar dos diversos posicionamentos do núcleo dos parasitos, as róptrias são rarefeitas, não se visualizam róptrias densas características de bradizoítos, os grânulos de amilopectina são poucos ou ausentes e grande número de grânulos densos.

Buscando analisar os eventos iniciais relacionados à entrada do parasito na célula hospedeira realizamos imunomarcagem para Lamp-1 nas culturas de 24 horas e observamos que a entrada do parasito não é dependente dessa vesícula (dado não apresentado). Conforme descrito na literatura, vesículas Lamp positivas são fonte de membrana para a formação de vacúolo parasitóforo para alguns parasitos como o *T. cruzi* em várias células de mamíferos, embora não tenha sido bem estudado em neurônios (Arantes and Andrews 2006; Albertti, Macedo et al. 2010). Como 80% da membrana do vacúolo parasitóforo do *Toxoplasma gondii* é cedido por membranas da célula hospedeira (Sibley and Boothroyd 1991; Caffaro and Boothroyd 2011),



e o neurônio possui um sofisticado e polarizado mecanismo de controle do citoesqueleto e do tráfico de membrana dependente de cálcio (Jobling and Gibbins 1999; Kapitein and Hoogenraad 2011), muito nos intrigou a presença de parasitos no citoplasma neuronal e nas estruturas neuríticas dilatadas distantes do corpo do neurônio, também descritas por Koshy e Cabral, 2014 e por Ferguson e colaboradores, 1987 (Ferguson and Hutchison 1987; Koshy and Cabral 2014). O estudo mais detalhado da fonte de membranas para a formação do vacúolo em neurônios, comparativamente com outras células menos polarizadas, assim como o estudo de como o neurônio consegue compensar essa demanda por elementos da membrana podem ser desdobramentos deste trabalho.

## 7. CONCLUSÃO

Nós concluímos que neurônios e células da glia isolados do GCS de murinos são permissivos à entrada, multiplicação, diferenciação e encistamento espontâneo da cepa atípica TgCTBr9 de *Toxoplasma gondii*. A infecção não causa morte ou degeneração significativa de neurônios e de células da glia *in vitro*, a despeito de produzir modificações nas estruturas neuríticas. A deposição de elementos da parede do cisto, que acompanha a diferenciação espontânea de bradizoítos, inicia-se em ambas as células com 72 horas p.i. e está concluída com 192 horas.

Nossos resultados apontam para estudos que visem às alterações da biologia neuronal durante a infecção. Especialmente a cistogenese precisa ser mais bem compreendida posto que atualmente não existem tratamentos para a forma encistada do parasito que assim permanece no organismo podendo sofrer reagudização e causar consequências graves ao hospedeiro.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertti, L. A., A. M. Macedo, et al. (2010). "Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in Trypanosoma cruzi invasion and intracellular development." *Microbes Infect* **12**(10): 784-789.
- Almeida-Leite, C. M., L. M. Galvao, et al. (2007). "Interferon-gamma induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by Trypanosoma cruzi-infected macrophages." *Neurobiol Dis* **25**(1): 170-178.
- Arantes, R. M. and N. W. Andrews (2006). "A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons." *J Neurosci* **26**(17): 4630-4637.
- Arantes, R. M., S. Lourenssen, et al. (2000). "Early damage of sympathetic neurons after co-culture with macrophages: a model of neuronal injury in vitro." *Neuroreport* **11**(1): 177-181.
- Aschner, M. and T. Syversen (2004). "Neurotoxicology: principles and considerations of in vitro assessment." *Altern Lab Anim* **32**(4): 323-327.
- Barbosa, B., E. d. A. Araújo, et al. (2009). "Myenteric neuronal atrophy induced by chronic infection caused by a genotype I Toxoplasma gondii strain in the rat ileum." *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR* **12**(2): 101-108.
- Barbosa, B. J. P., E. J. d. A. Araújo, et al. (2009). "ATROFIA NEURONAL MIENTÉRICA NO ÍLEO DE RATOS INFECTADOS CRONICAMENTE POR UMA CEPA GENÓTIPO I DE Toxoplasma gondii." *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia* **12**(2).
- Barragan, A. and L. D. Sibley (2002). "Trans epithelial migration of Toxoplasma gondii is linked to parasite motility and virulence." *J Exp Med* **195**(12): 1625-1633.
- Barragan, A. and L. D. Sibley (2003). "Migration of Toxoplasma gondii across biological barriers." *Trends Microbiol* **11**(9): 426-430.
- Black, M. W. and J. C. Boothroyd (2000). "Lytic cycle of Toxoplasma gondii." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(3): 607-623.
- Blader, I. J., I. D. Manger, et al. (2001). "Microarray analysis reveals previously unknown changes in Toxoplasma gondii-infected human cells." *J Biol Chem* **276**(26): 24223-24231.
- Bohne, W., J. Heesemann, et al. (1994). "Reduced replication of Toxoplasma gondii is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion." *Infect Immun* **62**(5): 1761-1767.
- Boothroyd, J. C. and M. E. Grigg (2002). "Population biology of Toxoplasma gondii and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?" *Curr Opin Microbiol* **5**(4): 438-442.
- Bossi, P. and F. Bricaire (2004). "Severe acute disseminated toxoplasmosis." *Lancet* **364**(9434): 579.
- Boyle, J. P. and J. R. Radke (2009). "A history of studies that examine the interactions of Toxoplasma with its host cell: Emphasis on in vitro models." *Int J Parasitol* **39**(8): 903-914.
- Butcher, B. A., L. Kim, et al. (2001). "Toxoplasma gondii tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B." *J Immunol* **167**(4): 2193-2201.
- Caffaro, C. E. and J. C. Boothroyd (2011). "Evidence for host cells as the major contributor of lipids in the intravacuolar network of Toxoplasma-infected cells." *Eukaryot Cell* **10**(8): 1095-1099.
- Carmen, J. C., L. Hardi, et al. (2006). "Toxoplasma gondii inhibits ultraviolet light-induced apoptosis through multiple interactions with the mitochondrion-dependent programmed cell death pathway." *Cell Microbiol* **8**(2): 301-315.
- Carneiro, A. C., G. M. Andrade, et al. (2013). "Genetic characterization of Toxoplasma gondii revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil." *J Clin Microbiol* **51**(3): 901-907.
- Carruthers, V. and J. C. Boothroyd (2007). "Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion." *Curr Opin Microbiol* **10**(1): 83-89.
- Carruthers, V. B. and Y. Suzuki (2007). "Effects of Toxoplasma gondii infection on the brain." *Schizophr Bull* **33**(3): 745-751.
- Carruthers, V. B. and F. M. Tomley (2008). "Microneme proteins in apicomplexans." *Subcell Biochem* **47**: 33-45.
- Chao, C. C., W. R. Anderson, et al. (1993). "Activated microglia inhibit multiplication of Toxoplasma gondii via a nitric oxide mechanism." *Clin Immunol Immunopathol* **67**(2): 178-183.
- Chiba, T. and T. H. Williams (1975). "Histofluorescence characteristics and quantification of small intensely fluorescent (SIF) cells in sympathetic ganglia of several species." *Cell Tissue Res* **162**(3): 331-341.
- Coelho, R. A., M. Kobayashi, et al. (2003). "Prevalence of IgG antibodies specific to Toxoplasma gondii among blood donors in Recife, Northeast Brazil." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **45**(4): 229-231.
- Contreras-Ochoa, C. O., A. Lagunas-Martinez, et al. (2013). "Toxoplasma gondii invasion and replication within neonate mouse astrocytes and changes in apoptosis related molecules." *Exp Parasitol* **134**(2): 256-265.
- Contreras, M., H. Schenone, et al. (1996). "Seroepidemiology of human toxoplasmosis in Chile." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **38**(6): 431-435.

- Courret, N., S. Darche, et al. (2006). "CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain." *Blood* **107**(1): 309-316.
- Creuzet, C., F. Robert, et al. (1998). "Neurons in primary culture are less efficiently infected by *Toxoplasma gondii* than glial cells." *Parasitol Res* **84**(1): 25-30.
- Da Gama, L. M., F. L. Ribeiro-Gomes, et al. (2004). "Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*." *Microbes Infect* **6**(14): 1287-1296.
- de Souza, W. (1974). "Fine structure of the conoid of *Toxoplasma gondii*." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **16**(1): 32-38.
- De Souza, W. M.-D., E.S.; Lemgruber, L.; Attias, M.; Vommaro, R.C. (2010). "Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*." *Scientia Medica* **20**(1): 12
- Dubey, A. K., C. Suresh, et al. (1998). "An enzyme-linked immunosorbent assay for the estimation of fungal biomass during solid-state fermentation." *Appl Microbiol Biotechnol* **50**(3): 299-302.
- Dubey, J. P., L. R. Ferreira, et al. (2012). "Oral oocyst-induced mouse model of toxoplasmosis: effect of infection with *Toxoplasma gondii* strains of different genotypes, dose, and mouse strains (transgenic, out-bred, in-bred) on pathogenesis and mortality." *Parasitology* **139**(1): 1-13.
- Dubey, J. P., E. G. Lago, et al. (2012). "Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology." *Parasitology* **139**(11): 1375-1424.
- Dubey, J. P., D. S. Lindsay, et al. (1998). "Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts." *Clin Microbiol Rev* **11**(2): 267-299.
- Dzierszinski, F., M. Nishi, et al. (2004). "Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation." *Eukaryot Cell* **3**(4): 992-1003.
- Esper, L., D. Roman-Campos, et al. (2012). "Role of SOCS2 in modulating heart damage and function in a murine model of acute Chagas disease." *Am J Pathol* **181**(1): 130-140.
- Fagard, R., H. Van Tan, et al. (1999). "Differential development of *Toxoplasma gondii* in neural cells." *Parasitol Today* **15**(12): 504-507.
- Ferguson, D. J. and W. M. Hutchison (1987). "The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **411**(1): 39-43.
- Ferguson, D. J. and W. M. Hutchison (1987). "An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice." *Parasitol Res* **73**(6): 483-491.
- Ferreira, A., M. Martins, et al. (2001). "Virulence for BALB/c mice and antigenic diversity of eight *Toxoplasma gondii* strains isolated from animals and humans in Brazil." *Parasite (Paris, France)* **8**(2): 99-105.
- Fischer, H. G., B. Nitzgen, et al. (1997). "Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain." *Parasitol Res* **83**(7): 637-641.
- Gao, J., C. Zhang, et al. (2013). "Effects of targeted suppression of glutaryl-CoA dehydrogenase by lentivirus-mediated shRNA and excessive intake of lysine on apoptosis in rat striatal neurons." *PLoS One* **8**(5): e63084.
- Gilbert, R. (2009). "Treatment for congenital toxoplasmosis: finding out what works." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**(2): 305-311.
- Glasner, P. D., C. Silveira, et al. (1992). "An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil." *Am J Ophthalmol* **114**(2): 136-144.
- Grimwood, J., J. R. Mineo, et al. (1996). "Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent." *Infect Immun* **64**(10): 4099-4104.
- Halonen, S. K., F. Chiu, et al. (1998). "Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes." *Infect Immun* **66**(10): 4989-4993.
- Halonen, S. K., W. D. Lyman, et al. (1996). "Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neurons and astrocytes." *J Neuropathol Exp Neurol* **55**(11): 1150-1156.
- Halonen, S. K., L. M. Weiss, et al. (1998). "Association of host cell intermediate filaments with *Toxoplasma gondii* cysts in murine astrocytes in vitro." *Int J Parasitol* **28**(5): 815-823.
- Hedger, J. H. and R. H. Webber (1976). "Anatomical study of the cervical sympathetic trunk and ganglia in the albino rat (*Mus norvegicus albinus*)." *Acta Anat (Basel)* **96**(2): 206-217.
- Hermes, G., J. W. Ajioka, et al. (2008). "Neurological and behavioral abnormalities, ventricular dilatation, altered cellular functions, inflammation, and neuronal injury in brains of mice due to common, persistent, parasitic infection." *J Neuroinflammation* **5**: 48.
- Hill, D. and J. P. Dubey (2002). "*Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention." *Clin Microbiol Infect* **8**(10): 634-640.
- Holland, G. N. (1999). "Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis." *Am J Ophthalmol* **128**(4): 502-505.
- Hutchins, J. B. and S. W. Barger (1998). "Why neurons die: cell death in the nervous system." *Anat Rec* **253**(3): 79-90.

- Jacobs, L., J. S. Remington, et al. (1960). "The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*." J Parasitol **46**: 11-21.
- Jobling, P. and I. L. Gibbins (1999). "Electrophysiological and morphological diversity of mouse sympathetic neurons." J Neurophysiol **82**(5): 2747-2764.
- Jones, T. C., K. A. Bienz, et al. (1986). "In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon." Infect Immun **51**(1): 147-156.
- Kafsack, B. F., Pena, J. D., Coppens, I., Ravindran, S., Boothroyd, J. C., & Carruthers, V. B. (2009). Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. Science, *323*(5913), 530-533.
- Kapitein, L. C. and C. C. Hoogenraad (2011). "Which way to go? Cytoskeletal organization and polarized transport in neurons." Mol Cell Neurosci **46**(1): 9-20.
- Kim, J. Y., M. H. Ahn, et al. (2006). "*Toxoplasma gondii* inhibits apoptosis in infected cells by caspase inactivation and NF-kappaB activation." Yonsei Med J **47**(6): 862-869.
- Kim, L., B. A. Butcher, et al. (2006). "*Toxoplasma gondii* genotype determines MyD88-dependent signaling in infected macrophages." J Immunol **177**(4): 2584-2591.
- Kim, L. and E. Y. Denkers (2006). "*Toxoplasma gondii* triggers Gi-dependent PI 3-kinase signaling required for inhibition of host cell apoptosis." J Cell Sci **119**(Pt 10): 2119-2126.
- Koshy, A. A. and C. M. Cabral (2014). "3-D Imaging and Analysis of Neurons Infected In Vivo with *Toxoplasma gondii*." J Vis Exp(94).
- Kurz, B., W. Bockeler, et al. (1998). "In vitro-model for *Toxoplasma gondii* invasion into neuroepithelial cells." Ann Anat **180**(4): 299-305.
- Lambert, H., N. Hitziger, et al. (2006). "Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination." Cell Microbiol **8**(10): 1611-1623.
- Lemgruber, L., P. Lupetti, et al. (2011). "The organization of the wall filaments and characterization of the matrix structures of *Toxoplasma gondii* cyst form." Cell Microbiol **13**(12): 1920-1932.
- Lonchamp, E., J. L. Dupont, et al. (2006). "The mouse cerebellar cortex in organotypic slice cultures: an in vitro model to analyze the consequences of mutations and pathologies on neuronal survival, development, and function." Crit Rev Neurobiol **18**(1-2): 179-186.
- Lovett, J. L., N. Marchesini, et al. (2002). "*Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca(2+) release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores." J Biol Chem **277**(29): 25870-25876.
- Luder, C. G., M. Giraldo-Velasquez, et al. (1999). "*Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation." Exp Parasitol **93**(1): 23-32.
- Luft, B. J. and J. S. Remington (1992). "Toxoplasmic encephalitis in AIDS." Clin Infect Dis **15**(2): 211-222.
- Madariaga-Domich, A. and J. Taxi (1986). "A comparative and quantitative study of small intensely fluorescent (SIF) cells in the sympathetic ganglia of some small mammals." Arch Anat Microsc Morphol Exp **75**(1): 1-17.
- Mains, R. E. and P. H. Patterson (1973). "Primary cultures of dissociated sympathetic neurons. I. Establishment of long-term growth in culture and studies of differentiated properties." J Cell Biol **59**(2 Pt 1): 329-345.
- Masliukov, P. M. and J. P. Timmermans (2004). "Immunocytochemical properties of stellate ganglion neurons during early postnatal development." Histochem Cell Biol **122**(3): 201-209.
- McKee, A. S., F. Dzierszynski, et al. (2004). "Functional inactivation of immature dendritic cells by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*." J Immunol **173**(4): 2632-2640.
- Melzer, T. C., H. J. Cranston, et al. (2010). "Host Cell Preference of *Toxoplasma gondii* Cysts in Murine Brain: A Confocal Study." J Neuroparasitology **1**.
- Meyer-Luehmann, M., M. Mielke, et al. (2009). "A reporter of local dendritic translocation shows plaque-related loss of neural system function in APP-transgenic mice." The Journal of Neuroscience **29**(40): 12636-12640.
- Miller, C. M., N. R. Boulter, et al. (2009). "The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*." Int J Parasitol **39**(1): 23-39.
- Morrisette, N. S. and L. D. Sibley (2002). "Cytoskeleton of apicomplexan parasites." Microbiol Mol Biol Rev **66**(1): 21-38; table of contents.
- Nash, P. B., M. B. Purner, et al. (1998). "*Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis." J Immunol **160**(4): 1824-1830.
- Nath, A. and A. P. Sinai (2003). "Cerebral Toxoplasmosis." Curr Treat Options Neurol **5**(1): 3-12.
- Neves, D. P. (2001). Parasitologia Humana, ATHENEU.
- Pan, H. C., Y. Q. Shen, et al. (2014). "Tegaserod, a small compound mimetic of polysialic acid, promotes functional recovery after spinal cord injury in mice." Neuroscience **277**: 356-366.

- Papazian-Cabanas, R. M., E. J. Araujo, et al. (2012). "Myenteric neuronal plasticity induced by *Toxoplasma gondii* (genotype III) on the duodenum of rats." *An Acad Bras Cienc* **84**(3): 737-746.
- Papazian-Cabanas, R. M., E. J. Araújo, et al. (2012). "Myenteric neuronal plasticity induced by *Toxoplasma gondii* (genotype III) on the duodenum of rats." *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **84**(3): 737-746.
- Paredes-Santos, T. C., E. S. Martins-Duarte, et al. (2013). "Spontaneous cystogenesis in vitro of a Brazilian strain of *Toxoplasma gondii*." *Parasitol Int* **62**(2): 181-188.
- Parlog, A., L. A. Harsan, et al. (2014). "Chronic murine toxoplasmosis is defined by subtle changes in neuronal connectivity." *Dis Model Mech* **7**(4): 459-469.
- Parlog, A., D. Schluter, et al. (2014). "*Toxoplasma gondii* induced neuronal alterations." *Parasite Immunol.*
- Purves, D., G. J. Augustine, et al. (2001). "Two Major Categories of Neurotransmitters."
- Ribeiro, A. C., M. S. Mutis, et al. (2008). "Association of the presence of residual anti-*Toxoplasma gondii* IgM in pregnant women and their respective family groups in Miracema, Northwest Rio de Janeiro, Brazil." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **103**(6): 591-594.
- Roberts, F. and R. McLeod (1999). "Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis." *Parasitol Today* **15**(2): 51-57.
- Roivainen, R. and J. Koistinaho (1996). "Histochemical detection of age- and injury-related changes in signal transduction in the superior cervical ganglion." *Microsc Res Tech* **35**(1): 20-31.
- Romano, J. D. and I. Coppens (2013). "Host Organelle Hijackers: a similar modus operandi for *Toxoplasma gondii* and *Chlamydia trachomatis*: co-infection model as a tool to investigate pathogenesis." *Pathog Dis* **69**(2): 72-86.
- Romano, J. D., C. de Beaumont, et al. (2013). "A novel co-infection model with *Toxoplasma* and *Chlamydia trachomatis* highlights the importance of host cell manipulation for nutrient scavenging." *Cell Microbiol* **15**(4): 619-646.
- Saeij, J. P., J. P. Boyle, et al. (2005). "Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host." *Trends Parasitol* **21**(10): 476-481.
- Schluter, D., M. Deckert, et al. (2001). "*Toxoplasma gondii* infection of neurons induces neuronal cytokine and chemokine production, but gamma interferon- and tumor necrosis factor-stimulated neurons fail to inhibit the invasion and growth of *T. gondii*." *Infect Immun* **69**(12): 7889-7893.
- Schwartzman, J. D. (1987). "Quantitative comparison of infection of neural cell and fibroblast monolayers by two strains of *Toxoplasma gondii*." *Proc Soc Exp Biol Med* **186**(1): 75-78.
- Sibley, L. and J. Boothroyd (1991). "Calcium regulated secretion and modification of host-cell endocytic compartments by *Toxoplasma*." *J Cell Biol* **115**(3): 2.
- Sibley, L. D. and J. C. Boothroyd (1992). "Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage." *Nature* **359**(6390): 82-85.
- Silveira, C., R. Belfort, Jr., et al. (1988). "Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families." *Am J Ophthalmol* **106**(3): 362-364.
- Sims, T. A., J. Hay, et al. (1989). "An electron microscope and immunohistochemical study of the intracellular location of *Toxoplasma* tissue cysts within the brains of mice with congenital toxoplasmosis." *Br J Exp Pathol* **70**(3): 317-325.
- Sinai, A. P. and K. A. Joiner (2001). "The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane." *J Cell Biol* **154**(1): 95-108.
- Soete, M., D. Camus, et al. (1994). "Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro." *Exp Parasitol* **78**(4): 361-370.
- Soete, M., B. Fortier, et al. (1993). "*Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro." *Exp Parasitol* **76**(3): 259-264.
- Souza, C. C. d. (2007). Aspectos da interação parasito-hospedeiro na infecção in vitro de microgliócitos por leishmania major *Departamento de Morfologia*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. **Mestrado**.
- Spires-Jones, T. L., A. de Calignon, et al. (2011). "Monitoring protein aggregation and toxicity in Alzheimer's disease mouse models using in vivo imaging." *Methods* **53**(3): 201-207.
- Staessen, J. A., J. Gasowski, et al. (1999). "Diagnostic thresholds for the clinical use of ambulatory blood pressure monitoring." *Acta Physiol Pharmacol Bulg* **24**(3): 53-64.
- Su, C., E. K. Shwab, et al. (2010). "Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*." *Parasitology* **137**(1): 1-11.
- Sugauara, E. Y., M. Sant'Ana Dde, et al. (2008). "Alterations of the myenteric plexus of the ileum and the descending colon caused by *Toxoplasma gondii* (genotype III)." *Arq Neuropsiquiatr* **66**(3A): 516-523.
- Suss-Toby, E., J. Zimmerberg, et al. (1996). "*Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16): 8413-8418.

- Suzuki, Y. (2002). "Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis." *J Infect Dis* **186 Suppl 2**: S234-240.
- Tomita, T., D. J. Bzik, et al. (2013). "The *Toxoplasma gondii* cyst wall protein CST1 is critical for cyst wall integrity and promotes bradyzoite persistence." *PLoS Pathog* **9**(12): e1003823.
- Vaz, R. S., V. Thomaz-Soccol, et al. "Serological prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women from Southern Brazil." *Parasitol Res* **106**(3): 661-665.
- Vaz, R. S., V. Thomaz-Soccol, et al. (2010). "Serological prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women from Southern Brazil." *Parasitol Res* **106**(3): 661-665.
- Walker, M. E., E. E. Hjort, et al. (2008). "*Toxoplasma gondii* actively remodels the microtubule network in host cells." *Microbes Infect* **10**(14-15): 1440-1449.
- Weiss, L. M., D. Laplace, et al. (1995). "A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites." *J Eukaryot Microbiol* **42**(2): 150-157.
- Weiss, L. M., Y. F. Ma, et al. (1998). "Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp70 stress response." *Infect Immun* **66**(7): 3295-3302.
- Yarovinsky, F. and A. Sher (2006). "Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*." *Int J Parasitol* **36**(3): 255-259.
- Zaniolo, L. M., A. V. da Silva, et al. (2012). "*Toxoplasma gondii* infection causes morphological changes in caecal myenteric neurons." *Exp Parasitol* **130**(2): 103-109.
- Zimmermann, S., P. J. Murray, et al. (2006). "Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling." *J Immunol* **176**(3): 1840-1847.

## ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 379 / 2012, relativo ao projeto intitulado "Análise da Resposta Diferencial da Glia e de Neurônios à Invasão por *Toxoplasma gondii*", que tem como responsável ROSA MARIA ESTEVES ARANTES, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 15/10/2013.

Este certificado espira-se em 15/10/2018.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 379 / 2012, related to the Project entitled "ANALYSIS OF DIFFERENTIAL RESPONSE OF GLIA AND NEURONS TO THE INVASION of *Toxoplasma gondii*", under the supervision of ROSA MARIA ESTEVES ARANTES, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 15/10/2013.

This certificate expires in 15/10/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 15/10/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)



**ANEXO II**

Title: EXPERIMENTAL INFECTION OF NEURONS AND GLIAL CELLS WITH A  
NEWLY ATYPICAL BRAZILIAN STRAIN OF *Toxoplasma gondii*

Corresponding Author: Dr. Rosa Maria Esteves Arantes

Authors: Joana Lobato-Barbosa, MSc; Maria M Noviello, PhD; Christiane T Cartelle, PhD;

Breno V Pinheiro, MSc; Ricardo W A Vitor, PhD;

Regular Article

Dear Dr. Arantes,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in  
Neurobiology of Disease.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier  
Editorial System for Neurobiology of Disease as an author:

<http://ees.elsevier.com/ynbdi/>

Your username is: [rosa@icb.ufmg.br](mailto:rosa@icb.ufmg.br)

Your password is: \*\*\*\*\*

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail  
with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Neurobiology of Disease. Should you have any  
questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Kristopher Zgorski

Editorial Office

Neurobiology of Disease/ Elsevier

525 B Street, Suite 1900

San Diego, CA 92101-4495 - USA

TEL: [619-699-6767](tel:619-699-6767) - FAX: [619-699-6855](tel:619-699-6855)

E-mail: [nbd@elsevier.com](mailto:nbd@elsevier.com)

### ANEXO III

Elsevier Editorial System(tm) for Neurobiology of Disease

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: EXPERIMENTAL INFECTION OF NEURONS AND GLIAL CELLS WITH A  
NEWLY ATYPICAL

BRAZILIAN STRAIN OF *Toxoplasma gondii*

Article Type: Regular Article

Keywords: primary neuron culture, *Toxoplasma gondii*, superior cervical ganglion, new strain, fluorescence microscopy.

Corresponding Author: Dr. Rosa Maria Esteves Arantes, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

First Author: Joana Lobato-Barbosa, MSc

Order of Authors: Joana Lobato-Barbosa, MSc; Maria M Noviello, PhD; Christiane T Cartelle, PhD; Breno V Pinheiro, MSc; Ricardo W A Vitor, PhD; Rosa Maria Esteves Arantes, MD, PhD

Abstract: Approximately two billion people are infected chronically with *Toxoplasma gondii* worldwide, showing unknown consequences. The infection is extremely successful. The parasite is able to cross the biological brain barrier and this result in a chronicle stage after the establishment of an immune response. The reactivation of the disease in immunocompromised patients causes toxoplasmic encephalitis that can lead to death. In Brazil, *T. gondii* shows an uncommon genetic population, which have been correlated to more severe manifestations of the disease. We used a newly isolated and genotyped virulent strain obtained from the peripheral blood of human newborns diagnosed with congenital toxoplasmosis from regions of Minas Gerais/ Brazil. In order to analyze the in vitro infection of neurons and glial cells by the virulent TgCTBr9 strain we used primary neuron and glial cell cultures, obtained by the removal of the superior cervical ganglia from C57BL/6 mice. The cultures were infected with a Multiplicity of Infection (MOI) of 10 parasites/cells and followed for 24, 48, 72, 96 and 192 hours post-infection and then fixed for analysis of neuronal damage, infection rate and immunofluorescence stain. We found the parasite in neurons and glial cells in all times analyzed, and the rate of infection in these cells increased

with time. At 96 hours of infection we started to detect the expression of components of the cyst wall and this deposition was completed 192 hours postinfection. At this time we also found bradyzoites. From 24 to 96 hours, the neuronal survival rate and the neurite density of infected cultures were not significantly different from their intraexperimental controls. However, evidence for neuronal damage was qualitatively observed at 96 hours postinfection when infection rate was significantly increased. Regarding neuronal function and morphology, we have found that  $\beta$ -tubulin is expressed around tachyzoites in infected neurons, which express progressive decrease of intensity of tyrosine hydroxylase staining over time. Our data shows that the virulent TgCTBr9 strain is not only able to infect neurons and glial cells in vitro, but also undergoes spontaneous encystment 192hs post-infection. This was an unprecedented result since there are no studies correlating this unusual strain and the pathogenesis of Toxoplasmosis in Brazil.

Suggested Reviewers: Louis M. Weiss M. Weiss Weiss M.D., M.P.H. Professor of Medicine and Pathology Professor of Medicine and Pathology, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Avenue Forchheimer 504 Bronx N.Y., 10641 louis.weiss@einstein.you.edu  
Expressive academic experience in the field

Norma Andrews PhD. Professor , Bioscience Research Building, [andrewsn@umd.edu](mailto:andrewsn@umd.edu)

Editorial and research experience in Cell Biology and cell invasion mechanisms

Vernon B Carruthers PhD. Faculty Member, Department of Microbiology and Immunology, University of Michigan Medical School, [vcarruth@umich.edu](mailto:vcarruth@umich.edu), experience in Pathogenesis of parasitic infections: Mechanisms of cell invasion and survival during infection

Opposed Reviewers:

Belo Horizonte, February 02th, 2015

Dr T. Greenamyre

Editor

Neurobiology of Disease

Ref: Manuscript submission

Dear Dr Grenamayre,

We are pleased to submit the manuscript entitled “EXPERIMENTAL INFECTION OF NEURONS AND GLIAL CELLS WITH A NEWLY ATYPICAL BRAZILIAN STRAIN OF *Toxoplasma gondii*” in order

to be appreciated by your editorial board for publication on Neurobiology of Disease.

Our work deals with a disease that affects approximately two billion people worldwide. This parasite crosses the biological brain barrier and encysts in brain cells. Here we used a newly isolated and genotyped virulent *Toxoplasma* strain obtained from the peripheral blood of human newborns diagnosed with congenital toxoplasmosis from regions of Minas Gerais/ Brazil in order to infect SCG-derived neurons and glial in vitro. Our results show a model to study entry, injury, interaction and encystation of *T. gondii* in its main target, the nervous system. The virulent strain here used is not only able to infect neurons and glial cells in vitro, but also undergoes spontaneous encystment 192hs post-infection. Since there are no current drugs that target the bradyzoite or the cyst, these new model can be beneficial to study the treatment approaches for a parasite that can remain in the body and may suffer acute relapse causing serious consequences to the host.

Looking forward to the opportunity to have your opinion and approval

Cordially Yours

Rosa Maria Esteves Arantes (MD, PhD) Associate Professor.

Departamento de Patologia Geral, Bloco C3 - 251, Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627 Campus Pampulha, 31270-901

Belo Horizonte, MG, Brazil. Contact information: +5531-3409-2896. Fax:+55(31) 34092879.

Email:

[rosa@icb.ufmg.br](mailto:rosa@icb.ufmg.br)

TgCTBr9 strain of *T. gondii* undergoes spontaneous encystation with 72 hours  
Neurons of the SCG sustain spontaneous differentiation with 24 hours in culture  
With 96 hours there is no neuronal death caused by TgCTBr9 strain of *T. gondii*  
TgCTBR9 strain of *T. gondii* promotes microtubule reorganization of neurons  
*T. gondii* decreases the production of tyrosin hydroxilases in SCG neurons in vitro

**EXPERIMENTAL INFECTION OF NEURONS AND GLIAL CELLS WITH A NEWLY ATYPICAL BRAZILIAN STRAIN OF *Toxoplasma gondii***

**Running title: *In vitro* Experimental *T. gondii* infection of neurons and glial cells**

**Joana Lobato Barbosa<sup>1</sup>; Christiane Teixeira Cartelle<sup>1</sup>, Maria de Lourdes Meirelles Noviello<sup>1</sup>; Breno Veloso Pinheiro<sup>2</sup>; Ricardo Wagner de Almeida Vitor<sup>2</sup>; Rosa Maria Esteves Arantes<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Department of Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

**The authors declare no conflict of interest.**

**Corresponding author:** Rosa Maria Esteves Arantes, e-mail: [rosa@icb.ufmg.br](mailto:rosa@icb.ufmg.br), Tel: 31 3409-2896 Fax: 31 3409-2879. Department of Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

## ABSTRACT

Approximately two billion people are infected chronically with *Toxoplasma gondii* worldwide, showing unknown consequences. The infection is extremely successful. The parasite is able to cross the biological brain barrier and this result in a chronicle stage after the establishment of an immune response. The reactivation of the disease in immunocompromised patients causes toxoplasmic encephalitis that can lead to death. In Brazil, *T. gondii* shows an uncommon genetic population, which have been correlated to more severe manifestations of the disease. We used a newly isolated and genotyped virulent strain obtained from the peripheral blood of human newborns diagnosed with congenital toxoplasmosis from regions of Minas Gerais/ Brazil. In order to analyze the *in vitro* infection of neurons and glial cells by the virulent TgCTBr9 strain we used primary neuron and glial cell cultures, obtained by the removal of the superior cervical ganglia from C57BL/6 mice. The cultures were infected with a Multiplicity of Infection (MOI) of 10 parasites/cells and followed for 24, 48, 72, 96 and 192 hours post-infection and then fixed for analysis of neuronal damage, infection rate and immunofluorescence stain. We found the parasite in neurons and glial cells in all times analyzed, and the rate of infection in these cells increased with time. At 96 hours of infection we started to detect the expression of components of the cyst wall and this deposition was completed 192 hours post-infection. At this time we also found bradyzoites. From 24 to 96 hours, the neuronal survival rate and the neurite density of infected cultures were not significantly different from their intraexperimental controls. However, evidence for neuronal damage was qualitatively observed at 96 hours post-infection when infection rate was significantly increased. Regarding neuronal function and morphology, we have found that  $\beta$ -tubulin is expressed around tachyzoites in infected neurons, which express progressive decrease of intensity of tyrosine hydroxylase staining over time. Our data shows that the virulent TgCTBr9 strain is not only able to infect neurons and glial cells *in vitro*, but also undergoes spontaneous encystment 192hs post-infection. This was an unprecedented result since there are no studies correlating this unusual strain and the pathogenesis of Toxoplasmosis in Brazil.

**Key words:** primary neuron culture, *Toxoplasma gondii*, superior cervical ganglion, new strain, fluorescence microscopy.

## INTRODUCTION

Toxoplasmosis is one of the most common zoonosis worldwide (Contreras, Schenone et al. 1996; Ribeiro, Mutis et al. 2008) and is caused by the parasite *Toxoplasma gondii*. The protozoan has two infective forms in intermediate host: tachyzoites, present in the acute phase and multiplies rapidly and bradyzoites, present during the chronic phase and which lie within cysts and multiplies slowly (De Souza 2010). The chronic phase may persist throughout the life of the patient and is characterized by the presence of cysts containing bradyzoites in muscle tissue and in the central nervous system (Hill and Dubey 2002; Nath and Sinai 2003), becoming severe in cases such as toxoplasmic encephalitis (TE) and ocular disease, mainly in congenital toxoplasmosis. In both cases, the main cells affected are the ones from the nervous system. Congenital infection can cause hydrocephalus, cerebral calcification, retinochoroiditis and abortion. TE affects immunocompromised patients due to reactivation of the disease and may be fatal (Staessen, Gasowski et al. 1999).

*T. gondii* has an unusual population structure that includes three clonal lineages, I, II and III, found in North America and Europe, and those genotypes influence the pathogenicity of the parasite in mice (Sibley and Boothroyd 1992; Howe and Sibley 1995). While type I strains are highly virulent and lethal in mice, types II and III are moderately virulent and trigger a chronic condition (Boothroyd and Grigg 2002). It is known that in Brazil, circulating strains have atypical genotype and the severe consequences of toxoplasmosis are more common (Gilbert 2009). Recently, Carneiro and collaborators isolated and genotyped 27 strains of *T. gondii* from newborns diagnosed with toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil. These strains were named TgCTBr 1 - 27 and have different virulence, being the TgCTBr9 strain associated with one congenitally infected newborn that died shortly after birth (Carneiro, Andrade et al. 2013).

*In vitro* studies using cells from mouse brain demonstrated that the tachyzoites are capable of infecting microglia (Chao, Anderson et al. 1993; Fischer, Nitzgen et al. 1997), astrocytes (Jones, Bienz et al. 1986; Halonen, Chiu et al. 1998) and neurons (Schwartzman 1987), forming cysts in all of these cells (Jones, Bienz et al. 1986). Cells with a high number of mitochondria, such as neurons, appear to be the primary target of this protozoa (Papazian-Cabanas, Araujo et al. 2012). Studies have described parasites in the peripheral nervous system (PNS), mainly in myenteric neurons (Sugaura, Sant'Ana Dde et al. 2008) due to the fact that the transmission of the parasite starts orally, but the results remain controversial.

Sugaura et al., 2008 showed that the interaction of *T. gondii* with the peripheral nervous system (PNS), lead to neuronal loss in the myenteric plexus, while Barbosa, 2009, described



only atrophy with reduction in the soma area, on the nucleus and on the ratio of nucleus/ soma of neurons (Barbosa 2009). Autonomic neurons of the PNS have not been tested for *in vitro* infection with *T. gondii* yet. A potential model for studying the interaction of parasite x host cell in the PNS is the use of primary cultured neurons from the superior cervical ganglion (SCG).

In this pioneer work, we describe the kinetics of structural and functional modifications of neurons and glial cells due to infection with *T. gondii in vitro* using a newly isolated parasite strain, TgCTBr9, from patients affected by congenital toxoplasmosis.

## **MATERIALS AND METHODS**

**CULTURE OF SCG NEURONS** - Primary cultures of SCG neurons were prepared as previously described (Blennerhassett and Bienenstock 1998; Arantes, Lourenssen et al. 2000). Briefly, SCG were removed from 1- to 3- day-old C57BL/6 mice and enzymatically dissociated in 0.3% trypsin II (Sigma Chemical Company). Isolated sympathetic neurons in a final concentration of  $2 \times 10^4$  cells/well were cultured on 24-well plates (Lavie) coated with Matrigel (Becton Dickinson) in 50 ng/ml Nerve growth factor (NGF, Alomone), 10% fetal bovine serum (FBS)/Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Sigma Chemical Company). All the procedures were approved by the committee of animal experimentation (CETEA n° 379/2012).

**INFECTION WITH *Toxoplasma gondii in vitro*** - Tachyzoites were obtained from three to four mice inoculated i.p. with 100 to 200 of TgCTBr9 strain (Carneiro, Andrade et al. 2013) per mouse. Tachyzoites were collected six to eight days after inoculation by washing the peritoneum with PBS pH 7.2. The material was first passed through a BD Ultra-fine insulin syringe to eliminate larger cells, the resulting material was filtered through polycarbonate membrane of  $3 \mu\text{m}$  (Ferreira, Martins et al. 2001) and centrifuged at  $2000 \times g$  for 10 minutes at room temperature with Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.2 and resuspended in DMEM, for the rupture of the cells and deposition. Tachyzoites were then added to the primary cultures of SCG, already established for 24 hours, at a 10 parasites/cell for three hours. The supernatant was removed and the wells were washed twice with  $500 \mu\text{L}$  of incomplete DMEM. After washing the wells,  $500 \mu\text{L}$  of complete DMEM with NGF were added to the cells. The cultures were incubated at  $37^\circ\text{C}$  in the presence of humidity and 5%  $\text{CO}_2$  through the experimental times of 24, 48, 72, 96 and 192 hours. After these periods the cultures were fixed with 10% buffered formaldehyde and used for photographic documentation, staining with Gaffney's one-hour Giemsa and immunofluorescence reactions.

**DETERMINATION OF THE RATE OF INFECTION** - The rate of infection was evaluated using cultures fixed and stained with Gaffney's one-hour Giemsa solution. In each coverslip 300 cells were counted under immersion objective of 100X with the Olympus BX51 optical microscope. Morphological criteria were applied to discriminate non-infected or infected glial cells and neurons. These criteria were validated by paired analysis of the cell markers expression in the immunostained counterparts.

**QUALITATIVE ANALYSIS OF CULTURES** -The morphology of viable neurons with intact neuritis, uniform diameter and cell body with normal appearance was analyzed. The infection-induced alterations were studied in glial cells, neuronal cell bodies and nerve endings through the observation and photographic documentation of the signs of cellular swelling, cell granularity, nuclear changes and reduction of refringence under phase contrast. All analyses were made using intraexperimental controls).

**ANALYSIS OF CELL SURVIVAL AND NEURITIC DENSITY** - Images of the homogenous cell distribution and highest cell concentration areas of fixed neuronal cultures were obtained under 100X magnification using an Olympus IX71 microscope equipped with a Hamamatsu Orca II cooled CCD camera and MetaMorph software. Ten images of the area with higher neuron density were acquired, and neurons were distinguished from glia cells by classical morphological characteristics (Arantes et al, 2000). Quantification of cell bodies was performed using ImageJ 1.48v analysis software. Quantification of neurite density were performed using a vertical line (250 $\mu$ m) overlapped in each image with a 2 cm gap between one another and the number of neuritis that crossed these lines (intersections) were counted.

**IMMUNOFLUORESCENCE** - Cultured cells were washed in PBS and permeabilized with PBS+Bovine Serum Albumin (BSA - Inlab, Brazil)+Triton X for 5 minutes, followed by incubation with 1:20 normal goat serum (NGS, Cripion Biotechnology, Brazil) for 45 min, at room temperature. Cells were then incubated with primary rabbit anti-PGP 9.5 (1:600, Millipore, USA) primary mouse anti-tubulin  $\beta$  III isoform (1:1000, Millipore, USA) or anti-tyrosine hydroxylase (1:300, Millipore, USA) antibodies overnight at 4°C. Cells were washed with PBS+BSA and then incubated with secondary antibody Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (1:400, Invitrogen, USA), 546 goat anti-mouse (1:400; Invitrogen, USA) and 488 goat anti-rabbit (1:400, Invitrogen, USA) for PGP, tubulin  $\beta$  III isoform and tyrosine hydroxylase, respectively for 30 minutes at room temperature. For staining of the nucleus Hoechst fluorescent dye (1:200, Invitrogen, USA) for 5 minutes was used. Technical control was performed by omission of the primary. All slides were examined in an Olympus BX51 fluorescent microscope and digital images were acquired for documentation through Image-Pro Express 4.0 (Media Cybernetics, MD, USA).

For parasite labelling, cells were washed in PBS and permeabilization with PBS+BSA+Saponina 0,08% for 5 minutes, followed by incubation with 1:20 normal goat

serum (NGS, Cripion Biotechnology, Brazil) for 45 min, at room temperature. Cells were then incubated with primary rabbit anti-BAG (1:50, kindly ceded by Dr. Rossiane C. Vommaro, UFRJ/RJ), primary anti-fluorescein *Dolichos biflorus* Agglutinin, DBA (1:5, Vector Laboratories) and rabbit antiserum to *T. gondii* (1:1000) (Ferreira, Martins et al. 2001) antibodies overnight at 37°C. Cells were then incubated with secondary antibody Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:400, Invitrogen, USA), for both BAG and rabbit anti-toxoplasma (produced by R.W.A. Victor, ICB, UFMG) for 2 hours at 37°C.

**STATISTICAL ANALYSIS** - The results were expressed as the mean and SEM of at least three independent experiments and analyzed for statistical significance using One-way ANOVA with post test Newmann-Keuls or T test. Probability values <0.05 were considered significant. The statistical tests were performed by GraphPad Prism 5.0 and InStat softwares. All analyses were made using intraexperimental controls.

## RESULTS

**QUALITATIVE ANALYSIS OF CULTURES** - Infected cultures showed discreet morphological alterations in comparison with controls. At bright field microscopy, cultures of 24 hours showed neurons with a neurite network, preferentially distributed in the center of the cover slip. These cells were polygonal, globoid, with sharp conical extensions from the tip ends, with characteristic birefringence, that can hardly be focused on a single plane. The neurite network formed from neuronal cell edges intersected and adhered to other neuritis, as well as to the surface of other neurons and glia cells. Such extensions were often surrounded by glial cytoplasmic processes, and presented characteristic varicosities of sympathetic neurons (rosary-bead-like formations). Neuronal cell bodies were interspersed with cells presenting morphological pattern described for glia cells (flat cells, with large cytoplasm, reniform nucleus, sometimes with evident nucleolus, adhered to the substrate, emitting radiated prolongations). This same pattern was found in infected cultures at all times, but neurons and glial cells had enlargement of the parasited cell body and of cell varicosities. There was also evidence of neuronal shrinkage and neuronal necrotic-degenerative changes of some cells. Mostly the presence of parasites inside the cells was easily demonstrated without disrupting the morphology of these cells (Fig. 1A and B).

**NEURONS AND GLIAL CELLS ARE INFECTED BY *T. gondii* AND THE RATE OF INFECTION INCREASES WITH TIME** - In all the times of culture, we found neurons and glial cells infected with *T. gondii* that is evidenced by Gaffney's one-hour Giemsa stain (Fig. 1C and D) and a progressive increase of infection rate was observed over time (Fig. 1E and F).

**THERE WERE NO NEURONAL DEATH BETWEEN 24 AND 96 HOURS** - In order to evaluate neuron survival, we compared the infected groups of 24 and 96 hours and observed that compared to their intra-experimental controls the infection was not associated to changes in neuronal survival rates at any time (Fig. 2A).

**THE NEURITY DENSITY PERSISTS WITH TIME IN INFECTED CULTURES** - To further evaluate neuronal integrity, we analyzed the neurite density in the cultures of 24, 48 and 96 hours. Although SCG neurite network tended to stabilize and show more complexity over time in control cultures, there were no significant differences between controls and infect neurite density of the cultures (Fig. 2B).

**INFECTED NEURONS SHOW DECREASED IN THEIR METABOLISM AND REARRANGEMENT OF THE CYTOSKELETON-**

To appreciate the structural morphology of neurons, the cultures were stained with anti- $\beta$  tubulin III antibody. The expression of  $\beta$ -tubulin is more intense around the parasite in infected neurons indicating a parasite-induced rearrangement of neuronal cytoskeleton (Fig. 2C and D).

To evaluate neuron metabolism we stained these cells with Tyrosine hydroxylase, an enzyme produced by healthy noradrenergic neurons, and we observed that the positive expression of Tyrosine hydroxylase decreases qualitatively in infected neurons as the time of culture increased (Fig. 3).

**BRADYZOITES ARE FOUND IN GLIAL CELLS IN CULTURES OF 192 HOURS -**

In cultures of 192 hours, we found parasites stained for the anti-BAG antibody, described to be expressed by bradyzoite form of the parasite (Fig. 4A and B).

**ELEMENTS OF THE CYST WALL OF *T. gondii* ARE PRESENT WITHIN 96 HOURS OF INFECTION IN NEURONS AND GLIAL CELLS -**

To evaluate encystation cultures were labeled with DBA, a cyst wall protein, and in 96 hours culture we see deposition of cyst wall materials in infected neurons and glial cells (Fig. 4C-F). We also verified that the process of depositing cyst wall components started at 96 hours with complete and well delimited cysts found at 192 hours (Fig. 4G and H).

**DISCUSSION**

Our results showed that infected cultures had discreet morphological alterations and that those were correlated to neuronal death, with shrinkage of cells, or to the presence of the parasite with enlargement of the parasited cells. In the initial times we do not correlate the death with the presence of the parasite, because the rate of infection is minimal with 24 hours and we believe that the cell death is related with the establishment of the primary neuronal culture since the cells are still differentiating. Although Creuzet et al., 1998, didn't find parasite replication inside rat hippocampal neurons, we not only found that the parasite was able to replicate in neurons of the superior cervical ganglion (SCG), but also that the rate of infection increases with time in neurons and in glial cells (Creuzet, Robert et al. 1998). Another important result of our kinetic observation was that the parasite is capable of forming cysts

inside those cells. According to the literature we also found a higher rate of infection of glial cells than neurons (data not shown). As shown by Creuzet et al., 1998 and Grimwood et al., 1996, the infection of cells is related to the cell cycle, and neurons are not dividing cells while glial cells are highly mitotic ones (Grimwood, Mineo et al. 1996; Creuzet, Robert et al. 1998). Other factors that may play a part in the glial cell parasitism preference may be the limiting cell size of neurons which are 10 times smaller than glial cells. Also the differential expression of cell surface receptors could be less abundant in neurons (Staessen, Gasowski et al. 1999). Differences in the behavior of the strain of the parasite studied also have to be monitored and compared to other known strains.

As the cultures showed little morphological alterations we evaluated neuronal survival which was not affected in infected cultures of 24 to 96 hours. It is important to notice that our data was obtained from intraexperimental comparisons, since the neuronal survival of SCG neurons *in vitro* may not only decrease over time but also be affected by mechanical manipulation of cultures (washes and medium changes). Also the number of cells obtained in primary cultures of neurons limits the number of replicates implicating in the impossibility of analyzing all time points derived from a single plating experiment.

Like others, we did not notice neuronal death between 24 and 96 hours of culture. When studying neurons from the peripheral nervous system (PNS), Barbosa et al., 2009 and Papazian-Cabanas et al., 2011 did not detect significant alterations with respect to the quantitative analysis of enteric neurons, but reduction of the area of the perikarium, nucleus, and cytoplasm of the myenteric neurons from infected animals were noticed through morphometric analysis. These authors also did not show infected neurons. We have to point out that our approach facilitates the detection of neuronal changes compared to the sampling methods of studying myenteric neurons *in vivo*. Also, we could demonstrate that despite the absence of neuronal loss, at 96 hours we observed neuronal infection and neuronal damage. Which mechanisms are operating to induce neuronal resistance and how it correlates to the encystation process *in vitro* are interesting questions to pursue.

The expression of neuronal markers such as  $\beta$  III tubulin isoform, and tyrosine hydroxylase (TH) were modified by the infection. Studies *in vivo* of *Toxoplasma gondii* interaction with neurons of the central nervous system (CNS) indicate that the parasite is able to disturb the neurofilaments and microtubules and surround himself with them (Walker, Hjort et al. 2008; Boyle and Radke 2009; Melzer, Cranston et al. 2010). This ability has been considered a survival mechanism since it could isolate the parasites from their host cell response (Walker, Hjort et al. 2008). In our hands, for the first time, we have described the same strategy in

neurons of the PNS cultivated *in vitro*.  $\beta$ -tubulin was found to be expressed in neurons cytoplasm surrounding the parasite at 96 hours of infection without great disruption of neuronal morphology, as observed also by brightfield microscopy.

On the other side, our findings of changes in the expression of TH may indicate that the parasite has the ability to interfere with normal enzyme production once it has been demonstrated that the parasite is capable of inhibit (Butcher, Kim et al. 2001) or increase (Kim, Ahn et al. 2006) the translocation of transcription factors such as NF- $\kappa$ B in infected cells. We hypothesize the expression of TH decreases over the time as an indication of the interference of the neuronal parasitism in the neuronal function and adaptation to the cyst formation process. Other enzymes and neuronal proteins may be affected by this process but further studies are necessary to prove these theory.

At 96 hours we started to see deposition of the cyst wall elements. By 192 hours the process was concluded and the entire wall of the cysts was easily seen inside non-identifiable cells. This is the first time in the literature that the process of *in vitro* encystation of a virulent, human, atypical strain of *T. gondii* is described in the peripheral nervous system. In fact, most peripheral neurons studied are myenteric neurons and the parasite was not found inside the cells (Sugauara, Sant'Ana Dde et al. 2008). Most of the groups studying encystation use some type of stimuli, pH and temperature alteration or addition of exogenous IFN- $\gamma$  (Bohne, Heesemann et al. 1994; Soete, Camus et al. 1994; Weiss, Laplace et al. 1995). We were able to show spontaneous encystation in neurons and glial cells by 96 hours of infection. Paredes-Santos et al., 2013, have also shown these processes with the EGS strain (Paredes-Santos, Martins-Duarte et al. 2013), but it is the first time that a virulent, human and atypical strain is demonstrated to being able to spontaneous encyst *in vitro* in neurons and glial cells of primary culture.

In conclusion, our study have shown that early on, neurons and glial cell are infected by the virulent strain, TgCTBr9, of *Toxoplasma gondii* and that these cells sustain tachyzoites replication, differentiation into bradyzoites and the formation of cysts. Together our results show a model to study entry, injury, interaction and encystation of *T. gondii* in its main target, the nervous system. Since there are no current drugs that target the bradyzoite or the cyst, these new model can be beneficial to study the treatment approaches for a parasite that can remain in the body and may suffer acute relapse causing serious consequences to the host, including death.



## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Prof. Rossiane C. Vommaro for having kindly provided the anti-BAG antibodies. J.L.Barbosa received a Msc scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil). C.T...Cartelle and M.L.M. Noviello were funded by PNPd/CAPES grant 2248/2011. R.M.E Arantes received CNPq Research Fellowship, CNPq Grant 458832/2014-6 and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG/Brazil) Grant PPM/2014 for financial support.

## REFERENCES

- Arantes, R. M., S. Lourenssen, et al. (2000). "Early damage of sympathetic neurons after co-culture with macrophages: a model of neuronal injury in vitro." *Neuroreport* **11**(1): 177-181.
- Barbosa, B. J. P. A., E.J.A.; Silva, A.V.; Sant'ana, D.M.G. (2009). "Atrofia neuronal mientérica no fêto de ratos infectados cronicamente por uma cepa genótipo I de *Toxoplasma gondii*." *Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR* **12**(2): 8.
- Blennerhassett, M. G. and J. Bienenstock (1998). "Sympathetic nerve contact causes maturation of mast cells in vitro." *J Neurobiol* **35**(2): 173-182.
- Bohne, W., J. Heesemann, et al. (1994). "Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion." *Infect Immun* **62**(5): 1761-1767.
- Boothroyd, J. C. and M. E. Grigg (2002). "Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?" *Curr Opin Microbiol* **5**(4): 438-442.
- Boyle, J. P. and J. R. Radke (2009). "A history of studies that examine the interactions of *Toxoplasma* with its host cell: Emphasis on in vitro models." *Int J Parasitol* **39**(8): 903-914.
- Butcher, B. A., L. Kim, et al. (2001). "*Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF-kappa B." *J Immunol* **167**(4): 2193-2201.
- Carneiro, A. C., G. M. Andrade, et al. (2013). "Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil." *J Clin Microbiol* **51**(3): 901-907.
- Chao, C. C., W. R. Anderson, et al. (1993). "Activated microglia inhibit multiplication of *Toxoplasma gondii* via a nitric oxide mechanism." *Clin Immunol Immunopathol* **67**(2): 178-183.
- Contreras, M., H. Schenone, et al. (1996). "Seroepidemiology of human toxoplasmosis in Chile." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **38**(6): 431-435.
- Creuzet, C., F. Robert, et al. (1998). "Neurons in primary culture are less efficiently infected by *Toxoplasma gondii* than glial cells." *Parasitol Res* **84**(1): 25-30.
- De Souza, W. M.-D., E.S.; Lemgruber, L.; Attias, M.; Vommaro, R.C. (2010). "Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*." *Scientia Medica* **20**(1): 12.
- Ferreira, A., M. Martins, et al. (2001). "Virulence for BALB/c mice and antigenic diversity of eight *Toxoplasma gondii* strains isolated from animals and humans in Brazil." *Parasite (Paris, France)* **8**(2): 99-105.
- Fischer, H. G., B. Nitzgen, et al. (1997). "Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain." *Parasitol Res* **83**(7): 637-641.
- Gilbert, R. (2009). "Treatment for congenital toxoplasmosis: finding out what works." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**(2): 305-311.
- Grimwood, J., J. R. Mineo, et al. (1996). "Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent." *Infect Immun* **64**(10): 4099-4104.

- Halonen, S. K., F. Chiu, et al. (1998). "Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes." *Infect Immun* **66**(10): 4989-4993.
- Hill, D. and J. P. Dubey (2002). "Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention." *Clin Microbiol Infect* **8**(10): 634-640.
- Howe, D. K. and L. D. Sibley (1995). "Toxoplasma gondii comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease." *J Infect Dis* **172**(6): 1561-1566.
- Jones, T. C., K. A. Bienz, et al. (1986). "In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon." *Infect Immun* **51**(1): 147-156.
- Kim, J. Y., M. H. Ahn, et al. (2006). "Toxoplasma gondii inhibits apoptosis in infected cells by caspase inactivation and NF-kappaB activation." *Yonsei Med J* **47**(6): 862-869.
- Melzer, T. C., H. J. Cranston, et al. (2010). "Host Cell Preference of *Toxoplasma gondii* Cysts in Murine Brain: A Confocal Study." *J Neuroparasitology* **1**.
- Nath, A. and A. P. Sinai (2003). "Cerebral Toxoplasmosis." *Curr Treat Options Neurol* **5**(1): 3-12.
- Papazian-Cabanas, R. M., E. J. Araujo, et al. (2012). "Myenteric neuronal plasticity induced by *Toxoplasma gondii* (genotype III) on the duodenum of rats." *An Acad Bras Cienc* **84**(3): 737-746.
- Paredes-Santos, T. C., E. S. Martins-Duarte, et al. (2013). "Spontaneous cystogenesis in vitro of a Brazilian strain of *Toxoplasma gondii*." *Parasitol Int* **62**(2): 181-188.
- Ribeiro, A. C., M. S. Mutis, et al. (2008). "Association of the presence of residual anti-*Toxoplasma gondii* IgM in pregnant women and their respective family groups in Miracema, Northwest Rio de Janeiro, Brazil." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **103**(6): 591-594.
- Schwartzman, J. D. (1987). "Quantitative comparison of infection of neural cell and fibroblast monolayers by two strains of *Toxoplasma gondii*." *Proc Soc Exp Biol Med* **186**(1): 75-78.
- Sibley, L. D. and J. C. Boothroyd (1992). "Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage." *Nature* **359**(6390): 82-85.
- Soete, M., D. Camus, et al. (1994). "Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro." *Exp Parasitol* **78**(4): 361-370.
- Staessen, J. A., J. Gasowski, et al. (1999). "Diagnostic thresholds for the clinical use of ambulatory blood pressure monitoring." *Acta Physiol Pharmacol Bulg* **24**(3): 53-64.
- Sugauara, E. Y., M. Sant'Ana Dde, et al. (2008). "Alterations of the myenteric plexus of the ileum and the descending colon caused by *Toxoplasma gondii* (genotype III)." *Arq Neuropsiquiatr* **66**(3A): 516-523.
- Walker, M. E., E. E. Hjort, et al. (2008). "Toxoplasma gondii actively remodels the microtubule network in host cells." *Microbes Infect* **10**(14-15): 1440-1449.
- Weiss, L. M., D. Laplace, et al. (1995). "A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites." *J Eukaryot Microbiol* **42**(2): 150-157.

## LEGEND

**Fig. 1: Morphological analysis and rates of infection in neuron and glial cells.** **A** infected culture of SCG with *T. gondii* showing neurons and glial cells at 24 hours; **B** 96 hours infected culture showing enlargement of the infected cells (arrows) and shrinkage of others cells (arrow head) showing signals of degeneration. Bar represents 10µm in 160X magnification. **C** Cultures stained with Gaffney's one-hour Giemsa showing infected neuron, **D** infected glial cell. The arrow indicates the parasites inside the cells. Bar represents 10µm in 1000X magnification. **E** Infection rate on neurons, \*\*\* significant difference ( $P < 0.0005$ ) comparing infected neurons in the experimental times of 24, 48, 72 and 96 hours, and **F** glial cells, \*\* significant difference ( $P < 0.005$ ) comparing infected glial

cells in the experimental times of 24, 48, 72 and 96 hours. Values represent the means  $\pm$  SEM, n = 5, representative of 3 independent experiments.

**Fig. 2: Quantification of *T.gondii* induced neuronal changes and tubulin  $\beta$  III expression.** The SCG was removed, dissociated and plated in the presence of matrigel in complete medium with NGF for 24 hours before the infection with 1:10 cell/parasite ratio; and left to interact for 3 hours with TgCTBr9 strain of *T. gondii*. **A** Neuronal survival; **B** Neurite density. **C** 96 hours infected cultures stained with tubulin  $\beta$  III (red) and anti-toxoplasmic serum (green) shows recruitment of tubulin  $\beta$  III in neurons, and **D** co-localization with the parasites. The insert in **C** shows cells and parasites stained by Hoechst. Bar represents 10 $\mu$ m in 400X magnification. Representative of 3 independent experiments.

**Fig. 3: Tyrosine hydroxylase labeling in neurons.** **A**, control and **B**, infected 24 hours culture immunostained with tyrosine hydroxylase. **C**, control and **D**, infected 48 hours culture showing in **D** less expression of the enzyme. **E**, control and **F**, infected 72 hours **G**, control and **H**, infected 96 hours culture showing that the expression of tyrosine hydroxylase decreases over the time in infected cultures. Bar represents 10 $\mu$ m in 400X magnification.

**Fig. 4: Spontaneous differentiation with encystment of *T.gondii* in SCG cells**

**A, C, E and G.** Hoechst labelling of parasites (small arrows point to parasite nucleus). **B** BAG labeling of bradyzoites on glial cells at 192 hours infected cultures stained with anti-BAG (dashed arrows indicate labeling of BAG on parasited cells). **C-E** DBA labeling of cysts in glial cells and neurons at 96 hours infected cultures stained with DBA and anti-PGP 9.5. **D** shows expression of DBA in glial cells. **F** shows DBA labelling in neurons stained by anti- PGP 9.5 (insert). **H** At 192 hours infected cultures show complete deposition of the cyst wall protein (DBA labelled) in the neuronal bodies. Arrows heads indicate labeling of DBA on parasited cells. Bar represents 10 $\mu$ m in 400X magnification.

Fig 1:

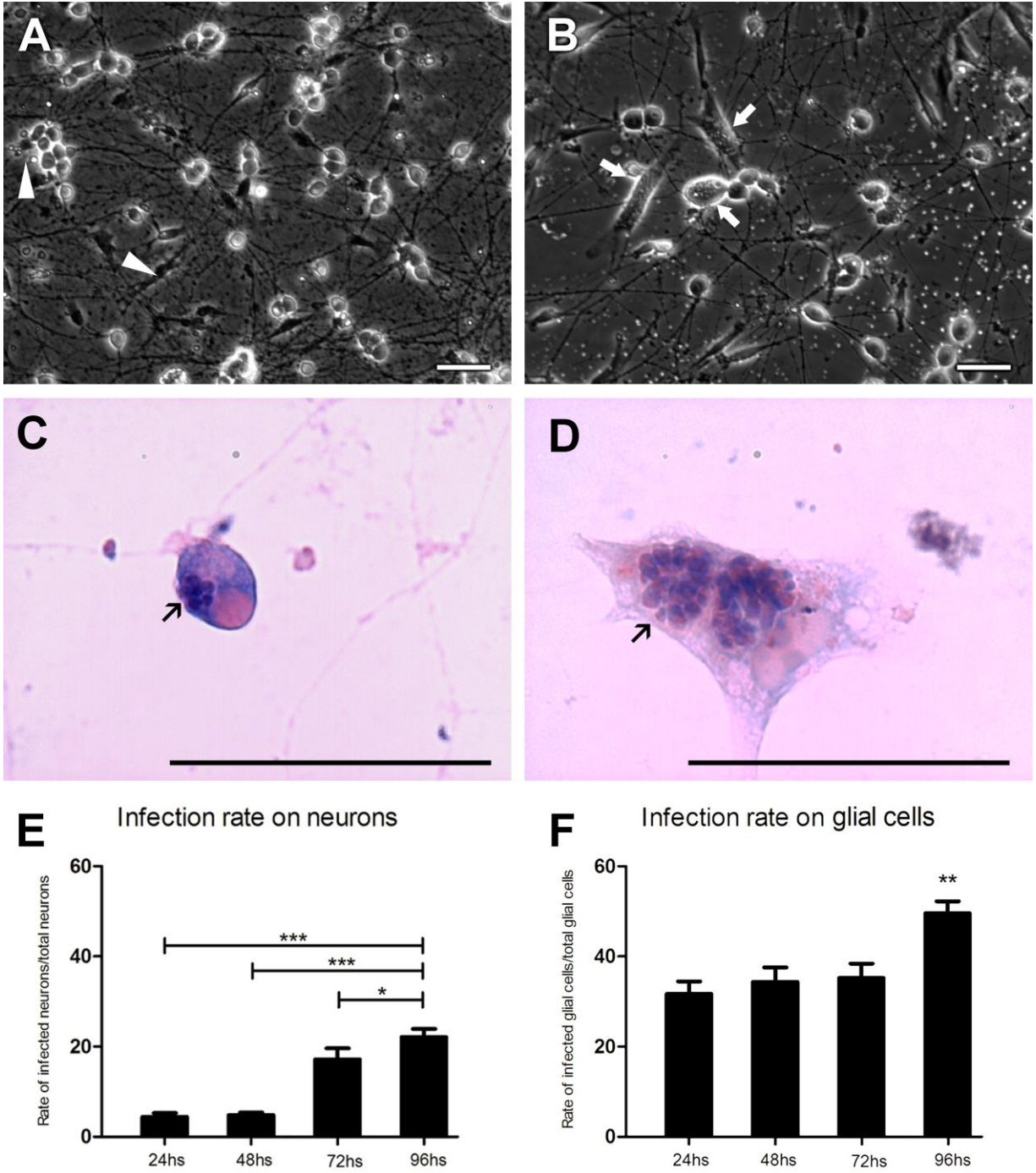


Fig 2:

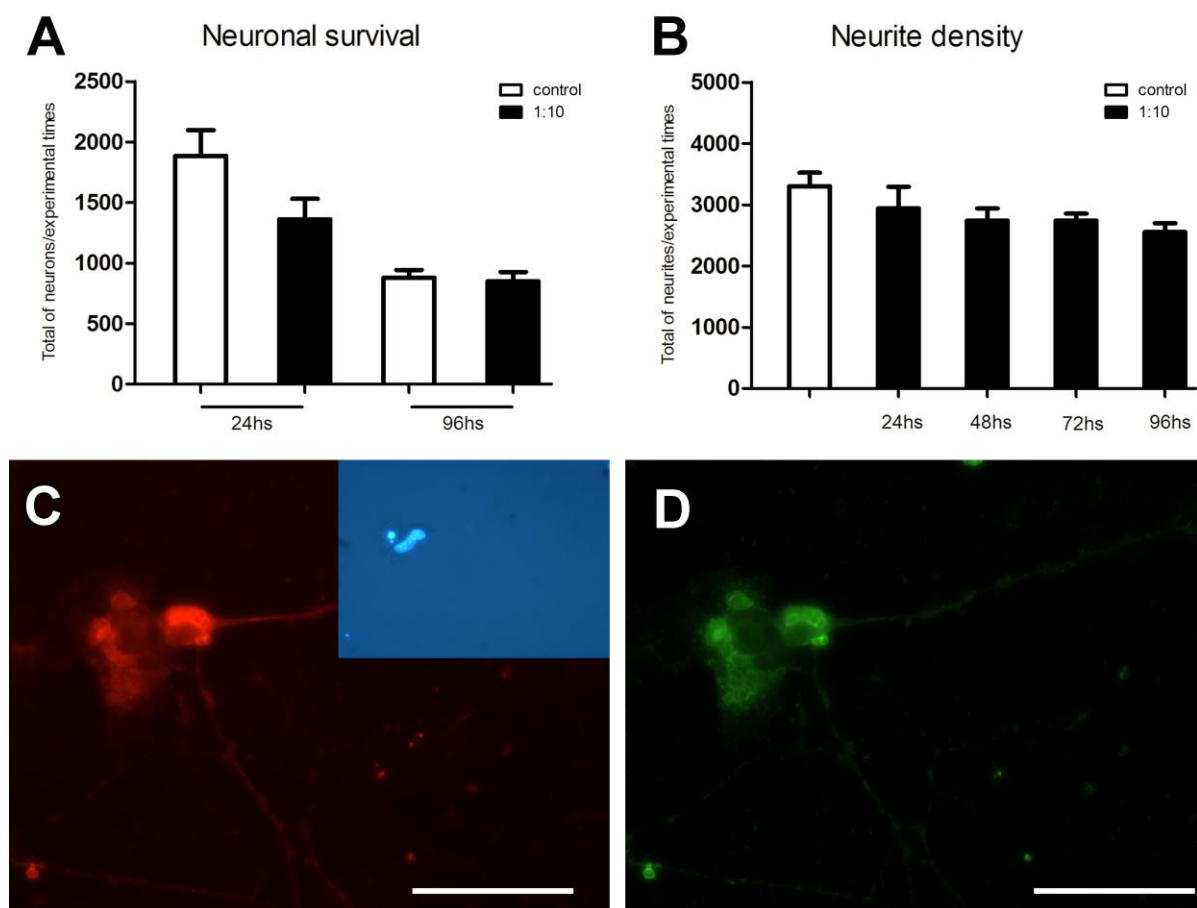


Fig 3:

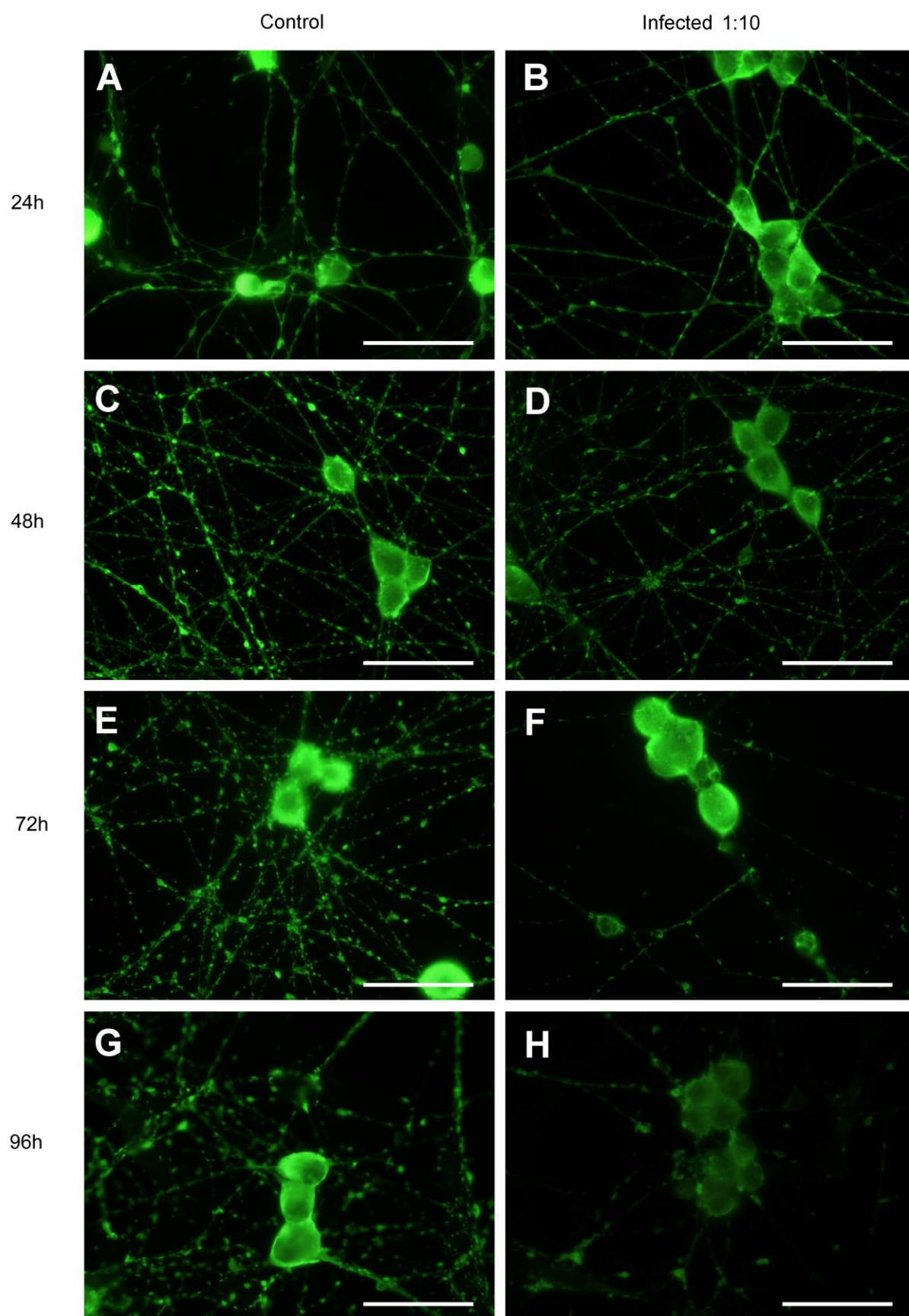


Fig: 4:

