

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ASPECTOS CELULARES DA INTERAÇÃO DE *TOXOPLASMA GONDII*
E ASTRÓCITOS MURINOS, *IN VITRO***

Natália Regina Marques

Rio de Janeiro

Junho de 2017

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ASPECTOS CELULARES DA INTERAÇÃO DE *TOXOPLASMA GONDII*
E ASTRÓCITOS MURINOS, *IN VITRO***

por

Natália Regina Marques

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências na área de Biologia Celular e
Molecular

Orientadora: Dr.^a Helene Santos Barbosa

Rio de Janeiro
Junho de 2017

Marques, Natália Regina .

Aspectos celulares da interação de *Toxoplasma gondii* e astrócitos murinos, in vitro / Natália Regina Marques. - Rio de Janeiro, 2017.
118 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Helene Santos Barbosa.

Bibliografia: f. 92-110

1. *Toxoplasma gondii*. 2. astrócitos. 3. cistogênese. 4. corpúsculos lipídicos. I. Título.

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ASPECTOS CELULARES DA INTERAÇÃO DE *TOXOPLASMA GONDII*
E ASTRÓCITOS MURINOS, *IN VITRO***

Apresentada por:

Natália Regina Marques

Banca examinadora:

Solange Lisboa de Castro - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz - Presidente

Elen Mello de Souza – Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Ana Carolina Stumbo - Instituto de Biologia – UERJ

Rubem F. Sadok Menna Barreto - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz - revisor e suplente

Erick Vaz Guimarães - Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz - suplente

Aprovada em: __19__/_06__/_2017__

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, saúde e pela oportunidade de estar concluindo o mestrado. Obrigada por estar sempre comigo, me protegendo e guiando meus caminhos.

À minha mãe, Sueli, por tudo que sempre fez e faz por mim!

À Dra. Helene Santos Barbosa pela orientação, pelos ensinamentos e por todo esforço e garra direcionados a essa dissertação, permitindo que ela fosse concluída. Obrigada!

À equipe do Laboratório de Biologia Estrutural (LBE) que ajudou de uma forma ou outra nos meus experimentos, contribuindo para que essa dissertação tivesse êxito.

À Amanda Seabra, a quem pude ensinar um pouco do que aprendi no laboratório. Obrigada por toda ajuda, companhia e conversas. Sucesso em sua jornada!

Às queridas amigas que fiz durante esses dois anos morando no Rio de Janeiro: Vanessa Fraga, Emanuelle Damasceno, Karina Leal, Renata Mendes, Lauana Ribas, Juci Ramos, Samira Pereira, Denise Alves... pelas trilhas, caminhadas na praia, no shopping, cinemas, shows, cafés, conversas, risadas, desabafos, conselhos e companheirismo. Obrigada pela amizade, por fazerem parte da minha vida e pelos momentos especiais, tornando minha estada aqui mais feliz.

À minha querida amiga Larissa Carniel, por mostrar que a verdadeira amizade resiste ao tempo e à distância. Obrigada pelo carinho e por estar presente, ainda que longe.

Ao Centro de Referência Professor Hélio Fraga e seu alojamento, onde residi durante o período do mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz-IOC.

Por fim, agradeço ao apoio financeiro das seguintes entidades: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Programa de Apoio Estratégico à Pesquisa (PAPES VI e VII-Fiocruz), Instituto Oswaldo Cruz e Fundação Oswaldo Cruz.

"Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais! Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por omitir."

Augusto Cury.

RESUMO

Toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* que afeta todos os animais de sangue quente, incluindo humanos. A capacidade de infectar qualquer célula nucleada permite que o *T. gondii* se dissemine para qualquer tecido do corpo, apresentando tropismo pelo tecido muscular esquelético e pelo sistema nervoso central (SNC), este último o mais seriamente acometido. Ao longo das últimas décadas, os astrócitos têm emergido pelas descobertas de suas inúmeras funções no SNC, sendo que alguns estudos têm responsabilizado este tipo celular como capaz de sustentar o encistamento de *T. gondii*. Já foi demonstrado que a infecção de células musculares esqueléticas por este parasito modula o metabolismo de lipídios e que os corpúsculos lipídicos são recrutados para o vacúolo parasitóforo. Tendo como base culturas primárias de astrócitos murinos, realizamos experimentos com os objetivos de avaliar comparativamente a infectividade de duas cepas polares (ME-49 e RH) de *T. gondii* frente a essas células, a participação de estruturas de astrócitos, como corpúsculos lipídicos (CL) e filamentos intermediários durante o ciclo lítico e a cistogênese de *T. gondii*. Nossos resultados apontam uma suscetibilidade de astrócitos em albergar os parasitos das duas cepas até 144 h após a infecção, com a presença de números variados de vacúolos parasitóforos e parasitos, bem como a presença de cistos. A infecção de células com a cepa ME-49 obteve um percentual máximo de 57,4%, enquanto as infectadas com a cepa RH, 38,97%. O desenvolvimento intracelular do parasito foi monitorado por análises citoquímica, que confirmou a presença de cistos e de corpúsculos lipídicos para a cepa ME-49. A análise ultraestrutural desta interação demonstrou o recrutamento importante de organelas de astrócitos, que incluem mitocôndrias, retículo endoplasmático e corpúsculos lipídicos, mantendo estreito contato com a membrana do vacúolo parasitóforo. Esta associação é mantida durante os diversos estágios do desenvolvimento intracelular do parasito, quer ao longo do curso do estabelecimento do ciclo lítico, como também durante o processo da cistogênese, quando essas organelas permanecem interagindo com a parede cística. Além disso, a proteína GFAP (proteína ácida fibrilar glial) associada ao filamento intermediário de classe-III é restruturada em torno do vacúolo parasitóforo e de maneira mais intensa ao redor do cisto. Este conjunto de dados sugere que o *T. gondii* é capaz de modular a resposta celular de astrócitos que certamente auxilia no estabelecimento do ciclo lítico e que garante sua manutenção no seu estágio dormente durante a fase crônica da infecção.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, astrócitos, cistogênese, corpúsculos lipídicos

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a disease that affects all warm-blooded animals, including humans. The ability to infect any nucleated cell allows *Toxoplasma gondii* to spread to any tissue in the body, demonstrating a parasite tropism for skeletal muscle tissue and central nervous system (CNS). In last few decades, astrocytes have emerged from the discoveries of their innumerable functions in the CNS, and some studies have blamed this cell type in the maintenance of supporting *T. gondii* cystogenesis. It was previously described that the infection of skeletal muscle cells by this parasite modulates host lipid metabolism and that lipid droplets (LD) are recruited to the parasitophorous vacuole. Based on primary cultures of murine astrocytes, we performed experiments with the objective of comparatively evaluating the infectivity of *T. gondii* polar strains (ME-49 and RH) against these cells, evaluating the participation of astrocyte structures, such as lipid droplets (LD) and intermediate filaments during the lytic cycle and the cystogenesis of *T. gondii*. Our results indicate a susceptibility of astrocytes to harbor the parasites of both strains up to 144 h after infection, with the presence of varied numbers of parasitophorous vacuoles and parasites, as well as the presence of cysts. The infection of cells with the ME-49 strain obtained a maximum percentage of 57.4%, while those infected with the RH strain, 38.97%. The intracellular development of the parasite was monitored by cytochemical analysis, which confirmed the presence of cysts and lipid droplets for the ME-49 strain. The ultrastructural evaluation of this interaction demonstrated the important recruitment of astrocyte organelles, which include mitochondria, endoplasmic reticulum and LD, maintaining close contact with the parasitophorous vacuole membrane. Such association is maintained during the various stages of intracellular development of the parasite both along the course of the establishment of the lytic cycle and during the process of cystogenesis when these organelles are in close contact to the cystic wall. In addition, the GFAP (glial fibrillary acid protein) associated with the class-III intermediate filament is restructured around the parasitophorous vacuole and more intensely around the cyst. Our data suggests that *T. gondii* modulates the cellular response of astrocytes in order to facilitate the establishment of the lytic cycle, guaranteeing its maintenance in dormancy stage during chronic phase of the infection.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, astrocytes, cystogenesis, lipid droplets.

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 TOXOPLASMA GONDII.....	1
1.2 FORMAS INFECTIVAS.....	2
1.2.1. Taquizoítos.....	2
1.2.2. Bradizoítos e cistos teciduais.....	3
1.2.3. Esporozoítos e oocistos.....	5
1.3. CICLO BIOLÓGICO DO T. GONDII.....	7
1.4. CEPAS DE T. GONDII.....	8
1.5. CICLO INTRACELULAR.....	9
1.5.1 Ciclo lítico.....	9
1.5.2 Cistogênese.....	11
1.6. ASTRÓCITOS.....	13
1.6.1 Biologia.....	13
1.6.2 Funções.....	14
1.6.3 Astrócitos e patologias do SNC.....	16
1.6.4 SNC e <i>T. gondii</i>	17
1.7. CORPÚSCULOS LIPÍDICOS.....	18
1.7.1 CL e patógenos.....	20
1.8. TOXOPLASMOSE.....	21
II. JUSTIFICATIVA.....	24
III. OBJETIVOS.....	25
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS CORTICAIS MURINOS.....	26
4.1.1 Isolamento e plaqueamento de células corticais mistas.....	26
4.1.2 Obtenção de uma cultura rica em astrócitos.....	27
4.2 CULTURA DA LINHAGEM CELULAR EPITELIAL RENAL (VERO).....	28
4.3 OBTENÇÃO DE PARASITOS E INTERAÇÃO PARASITO-CÉLULA.....	28
4.4 ENSAIOS DE INFECTIVIDADE.....	29
4.5 DETERMINAÇÃO DA INFECÇÃO DE ASTRÓCITOS PELO <i>T. GONDII</i> POR MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO.....	29
4.6 ANÁLISES CITOQUÍMICAS E IMUNOCITOQUÍMICAS.....	30

4.6.1 Revelação de corpúsculos lipídicos (CL).....	30
4.6.2 Revelação de GFAP (“Glial Fibrillary Acidic Protein”).....	30
4.6.3 Monitoramento dos estágios evolutivos de <i>T. gondii</i>	31
4.7 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	31
4.8 ASPECTOS ÉTICOS	32
V. RESULTADOS	33
5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE ASTRÓCITOS MURINOS	33
5.2 CINÉTICA DA INFECÇÃO E O ESTABELECIMENTO DA CISTOGÊNESE EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE ASTRÓCITOS MURINOS DA LINHAGEM SWISS WEBSTER FRENTE A CEPAS POLARES DE <i>T. GONDII</i>	36
5.3. ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIIS DA INTERAÇÃO DE <i>T. GONDII</i> E ASTRÓCITOS.....	51
5.4 PARTICIPAÇÃO DE CL DE ASTRÓCITOS NA INFECÇÃO PELO <i>T. GONDII</i>	61
5.5 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DA PROTEÍNA GFAP DE ASTRÓCITOS DURANTE A SUA INTERAÇÃO COM <i>T. GONDII</i>	73
VI. DISCUSSÃO	75
VII. CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	92

I. INTRODUÇÃO

1.1 TOXOPLASMA GONDII

O protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* é um dos patógenos de maior distribuição na Terra e não conhece fronteiras geográficas. O *T. gondii* é o agente causador da toxoplasmose, uma zoonose de importância médica e veterinária, considerando-se que pode causar aborto e doenças congênitas em seus hospedeiros intermediários e definitivos (Tenter *et al.*, 2000; Dubey, 2010). O parasito é capaz de infectar e se replicar em qualquer célula nucleada de aves e mamíferos, incluindo o homem. Estima-se que a sua soroprevalência em humanos varie de 30 a 70%, dependendo da região mundial (Blanchard *et al.*, 2015).

Os hospedeiros intermediários e definitivos podem adquirir a infecção principalmente: pela ingestão de oocistos do meio ambiente, pela ingestão de cistos teciduais presentes em carne crua ou malcozida, ou ainda por transmissão transplacentária de taquizoítos (Remington e Desmonts, 1990; Evans, 1992; Dubey *et al.*, 1998; Tenter *et al.*, 2000).

Numa revisão recente realizada por Dubey (2010), *T. gondii* foi classificado taxonomicamente como:

Filo: Apicomplexa (Levine, 1970)

Classe: Sporozoasida (Leukart, 1879)

Sub-Classe: Coccidiasina (Leukart, 1879)

Ordem: Eimeriorina (Leger, 1911)

Família: Toxoplasmatidae (Biocca, 1956)

Gênero: *Toxoplasma* (Nicole e Manceaux, 1909)

Espécie: *Toxoplasma gondii* (Nicole e Manceaux, 1909)

O protozoário foi descrito pela primeira vez em 1908 na Tunísia, norte da África por Nicole e Manceaux, que o isolaram de um roedor (*Ctenodactylus gundi*), que era utilizado para pesquisas sobre leishmaniose. A princípio acreditaram que era um organismo do gênero

Leishmania, porém descobriram que se tratava de uma nova espécie. No mesmo ano no Brasil, o parasito era descrito por Splendore (1908), que o isolou de coelhos, denominando-o de *Toxoplasma cuniculi*. Um ano mais tarde, foi verificado que se tratava de uma única espécie, prevalecendo a designação *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909; Splendore, 1909).

1.2 FORMAS INFECTIVAS

O nome *Toxoplasma* (*toxos* = arco; *plasma* = forma) deriva do seu formato. *T. gondii* pode assumir 3 formas infecciosas, responsáveis pela transmissão da toxoplasmose: taquizoítos (livres), bradizoítos (em cistos) e esporozoítos (em oocistos) (Hill *et al.*, 2005). Estas formas são estruturalmente semelhantes, porém apresentam algumas diferenças em suas organelas, que possuem papéis cruciais nos processos de adesão e invasão (Dubey *et al.*, 1998).

1.2.1. Taquizoítos

O termo "taquizoíto" (*tachos* = rápido em grego) refere-se ao estágio de rápida multiplicação em quaisquer células nucleadas dos hospedeiros intermediários e em células não epiteliais intestinais dos hospedeiros definitivos. O taquizoíto é uma célula polarizada, que possui forma alongada, sendo sua região anterior afilada e a posterior arredondada. Medem cerca de 6 µm de comprimento e 2 µm de largura. Ultraestruturalmente, o taquizoíto é revestido por uma película trimembranar e possui diversas organelas, incluindo uma mitocôndria única e ramificada, retículo endoplasmático liso e rugoso, Golgi, apicoplasto, corpos lipídicos, grânulos densos, citoesqueleto, microporo e um núcleo situado em sua região mediana. Formando seu complexo apical (região anterior ou apical do corpo) estão presentes: o anel polar, os anéis pré-conoidais, os microtúbulos intraconoidais, o conóide, além das organelas secretórias, róptrias e micronemas (Fig. 1.2) (de Souza *et al.*, 2010; Paredes-Santos *et al.*, 2012). Embora os taquizoítos não possuam meios de locomoção como cílios, flagelos ou pseudópodes, podem se mover por deslizamento, flexionamento, ondulações e rotações. O taquizoíto invade a célula por penetração ativa, e o processo se

inicia quando entra em contato com a superfície celular e secreta proteínas dos micronemas e róptrias. Após invadir a célula, o taquizoíto encontra-se envolto pela membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), que tem sua composição derivada de moléculas secretadas pelo parasito, além daquelas oriundas da célula hospedeira (Dubey *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 2005; de Souza *et al.*, 2010). Este vacúolo consegue evitar a fusão com as vias endolisossomais da célula hospedeira, permitindo a sobrevivência e desenvolvimento do parasito. No interior do vacúolo parasitóforo o *T. gondii* se divide assexuadamente por endodiogenia, um processo que ocorre a cada 6-8 h (Mordue *et al.*, 1999; Halonen e Weiss, 2013; Francia e Striepen, 2014), que consiste na formação de duas progênies, a partir da célula mãe, a qual é então consumida pelas descendentes antes de se separarem dela (Fig. 1.1) (Dubey *et al.*, 1998).

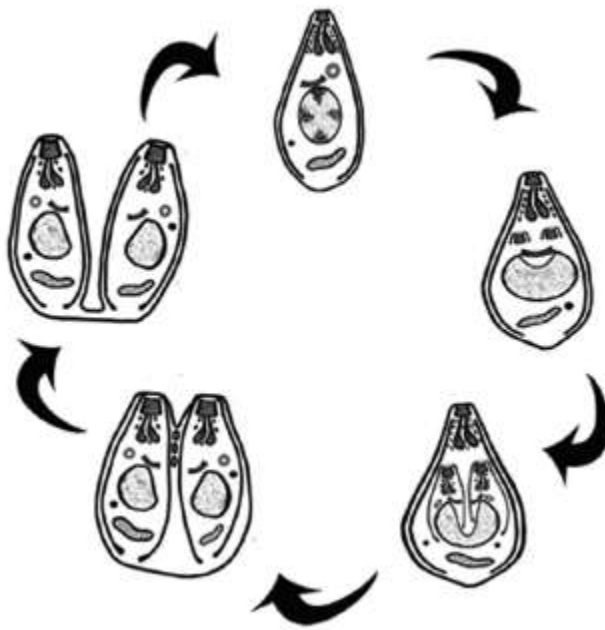


Figura 1.1. Processo de divisão de taquizoítoes, bradizoítoes e esporozoítoes por endodiogenia (de Souza *et al.*, 2010).

1.2.2. Bradizoítoes e cistos teciduais

Os bradizoítoes (*brady* = lento em grego) são morfologicamente semelhantes aos taquizoítoes, porém se replicam lentamente. Ultraestruturalmente, bradizoítoes apresentam as

mesmas organelas que os taquizoítos, no entanto, possuem o núcleo localizado em direção à extremidade posterior, enquanto nos taquizoítos essa estrutura é mais centralizada; possuem róptrias eletrondensas, maior abundância de micronemas, menos grânulos densos e maior número de grânulos de amilopectina. Corpos lipídicos não são encontrados em bradizoítos, ocorrendo ocasionalmente em taquizoítos. Por outro lado, bradizoítos são menos suscetíveis à destruição por enzimas proteolíticas do que taquizoítos. Ambos estágios são intracelulares e se dividem por endodiogenia. Os bradizoítos possuem aproximadamente 7 μm de comprimento x 1,5 μm de largura e estão presentes no interior de cistos, que possuem a parede cística elástica e fina (Montoya e Liesenfeld, 2004; Hill *et al.*, 2005; Dubey, 2010; Weiss e Kim, 2011).

O tamanho dos cistos depende de fatores como idade, célula hospedeira e cepa de *T. gondii*. Cistos jovens podem ter 5 μm de diâmetro e abrigar apenas dois bradizoítos, enquanto cistos maduros podem abrigar milhares de parasitos. Bradizoítos se desenvolvendo em cistos são comuns em uma variedade de tecidos, sendo encontrados principalmente nos tecidos neurais, como cérebro e retina, bem como nos musculares, como coração e músculos esqueléticos. Cistos cerebrais são geralmente esféricos e podem atingir até 70 μm de diâmetro, enquanto cistos intramusculares são alongados e podem ter 100 μm de comprimento (Fig. 1.2) (Weiss e Kim, 2007; Dubey, 2010).

Bradizoítos no interior de cistos estão protegidos do sistema imune, caracterizando a fase crônica da toxoplasmose (Weiss e Kim, 2011), podendo persistir por toda a vida do hospedeiro (Ferguson e Hutchison, 1987). No entanto, existem riscos de reativação da fase aguda da infecção quando o sistema imune do hospedeiro se encontra comprometido, como por exemplo, em pacientes portadores de HIV e/ou sob tratamento com corticosteróides, radiação, drogas antineoplásicas e outros transtornos imunológicos (Suzuki *et al.*, 1988; Gross *et al.*, 1997).

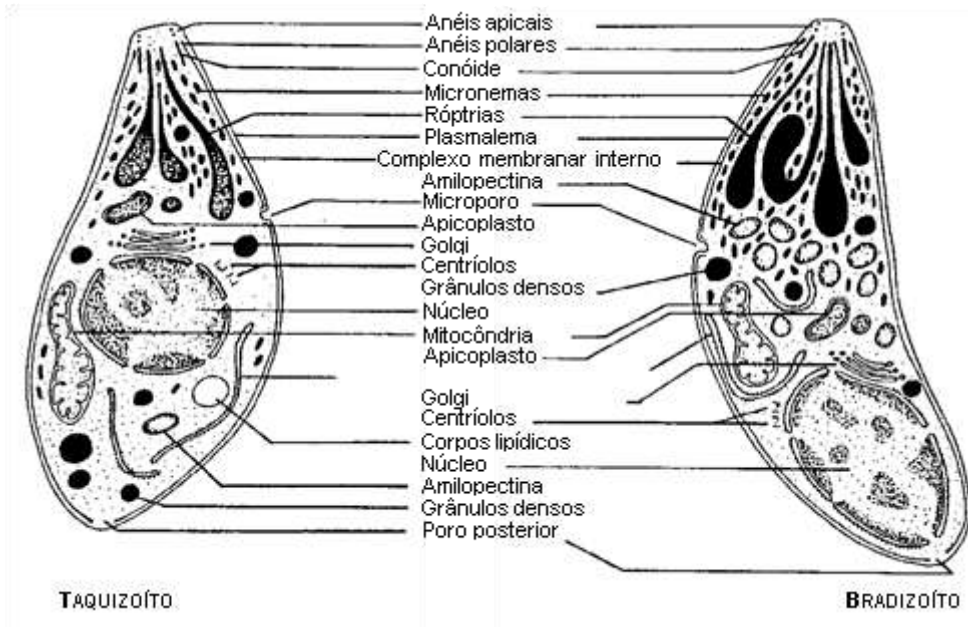


Figura 1.2. Desenhos esquemáticos de um taquizoíto e de um bradizoíto de *T. gondii*. Adaptado de Dubey *et al.* (1998).

1.2.3. Esporozoítos e oocistos

Esporozoítos são as formas infectivas de *T. gondii* presentes no interior de oocistos. Cada oocisto contém dois esporocistos, os quais contêm quatro esporozoítos cada. Os esporozoítos possuem um tamanho de cerca de 8 μm de comprimento por 2 μm de largura e, ultraestruturalmente, são semelhantes aos taquizoítos, embora apresentem um núcleo subterminal e maior abundância de algumas organelas, como róptrias de morfologia mista, eletrondensas e eletron-lucentes, micronemas, grânulos de amilopectina e corpos lipídicos (Fig. 1.3) (Dubey, 2010; Dubey *et al.*, 1970).

Membros da família dos felídeos são os hospedeiros definitivos do *T. gondii*, podendo disseminar oocistos depois de ingerir quaisquer dos três estágios infecciosos. Somente no intestino desses animais ocorre a reprodução sexuada do parasito, resultando na produção de oocistos. Durante a fase aguda da infecção milhões de oocistos são eliminados nas fezes dos felídeos por 7-21 dias. (Dubey *et al.*, 1970, Frenkel, 1973). Os oocistos infecciosos são ovoides, medem 11 x 13 μm e possuem uma parede rica em proteínas, que atua como uma barreira evitando que os esporozoítos no seu interior sofram ataques físicos e químicos (Ferguson *et al.*, 1979; Speer *et al.*, 1998; Dumètre *et al.*, 2013; Freppel *et al.*, 2016). No ambiente, sob condições de umidade, aeração e temperatura quente, os oocistos eliminados

nas fezes de gatos esporulam dentro de 1 a 5 dias, tornando-se infecciosos. São muito resistentes e podem sobreviver a períodos de frio e desidratação, permanecendo viáveis em solos úmidos ou arenosos por um ano ou mais (Frenkel, 1988; Jackson e Hutchison, 1989; Evans, 1992; Dubey, 1986; Dubey *et al.*, 1998).

A ingestão de água, frutas e vegetais crus contaminados com oocistos têm sido identificadas como importantes fatores de risco para a infecção humana (Dubey 2010, Pereira *et al.*, 2010). Uma vez ingeridos, os oocistos sofrem ação do suco gástrico rompendo a sua parede e liberando os esporozoítos que ao penetrarem no epitélio intestinal se diferenciam em taquizoítos (Frenkel, 1988).

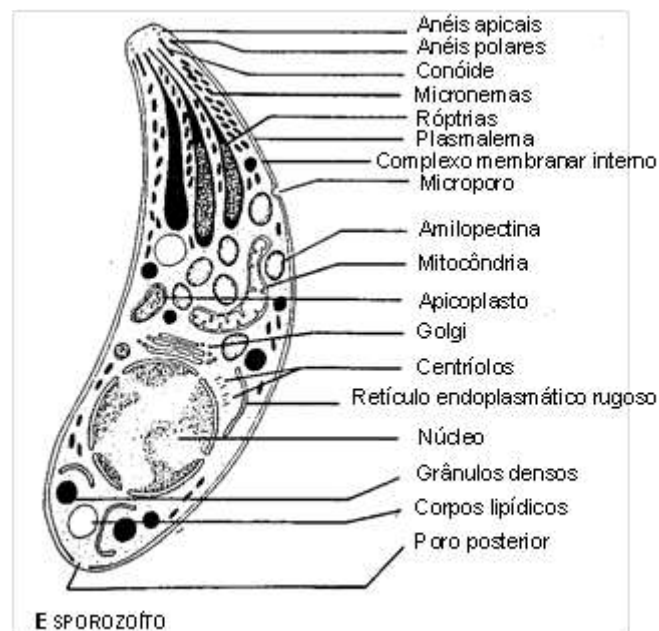


Figura 1.3. Esquema de um esporozoítio de *T. gondii*. Adaptado de Dubey *et al.* (1998).

1.3. CICLO BIOLÓGICO DO *T. GONDII*

O ciclo de vida de *T. gondii* (Fig. 1.4) é complexo, possuindo uma fase sexuada, que ocorre nas células epiteliais intestinais dos hospedeiros definitivos, ou seja, gatos e outros felídeos, e uma fase assexuada, que ocorre tanto nesses animais quanto nos hospedeiros intermediários, animais de sangue quente, incluindo aves e o homem (Dubey *et al.*, 1998). A infecção dos hospedeiros intermediários pode ocorrer pela ingestão de cistos e oocistos, que tem suas paredes rompidas por enzimas gástricas, dos quais bradizoítos e esporozoítos, respectivamente, emergem e penetram nas células da mucosa intestinal, onde se convertem em taquizoítos (Rougier *et al.*, 2016). Os taquizoítos se disseminam, multiplicando-se, o que ocasiona a ruptura da célula e liberação dos parasitos na corrente sanguínea, para que invadam novas células hospedeiras, caracterizando o ciclo lítico (Sibley *et al.*, 2009). Fatores como a pressão do sistema imune, estresse ambiental, dentre outros, favorecem a diferenciação de taquizoítos em bradizoítos, que se multiplicam lentamente, preferencialmente dentro das células de vida longa, como as do sistema nervoso central (SNC) e musculatura esquelética, o que assegura a manutenção da infecção por longos períodos. Os bradizoítos formam cistos, e embora possuam um metabolismo lento, podem romper o cisto, se transformando novamente em taquizoítos e invadindo novas células, para então repetirem o ciclo lítico ou se convertem em bradizoítos formando novos cistos (Frenkel, 1973; Dubey *et al.*, 1997; Tenter *et al.*, 2000). A fase sexuada ocorre nos enterócitos dos felídeos, culminando na formação de oocistos não esporulados, que são eliminados aos milhares no ambiente através de suas fezes (Dubey *et al.*, 1970). Os oocistos se tornam esporulados mediante condições propícias de temperatura, umidade e oxigenação, podendo permanecer assim por muitos anos. São resistentes aos desinfetantes químicos comuns e forças físicas, e podem infectar animais de sangue quente quando ingeridos através da água ou alimentos contaminados. Os oocistos também são infecciosos para os hospedeiros definitivos, embora de forma pouco eficiente (Frenkel *et al.*, 1975; Dubey *et al.*, 1998; Robert-Gangneux *et al.*, 2012).

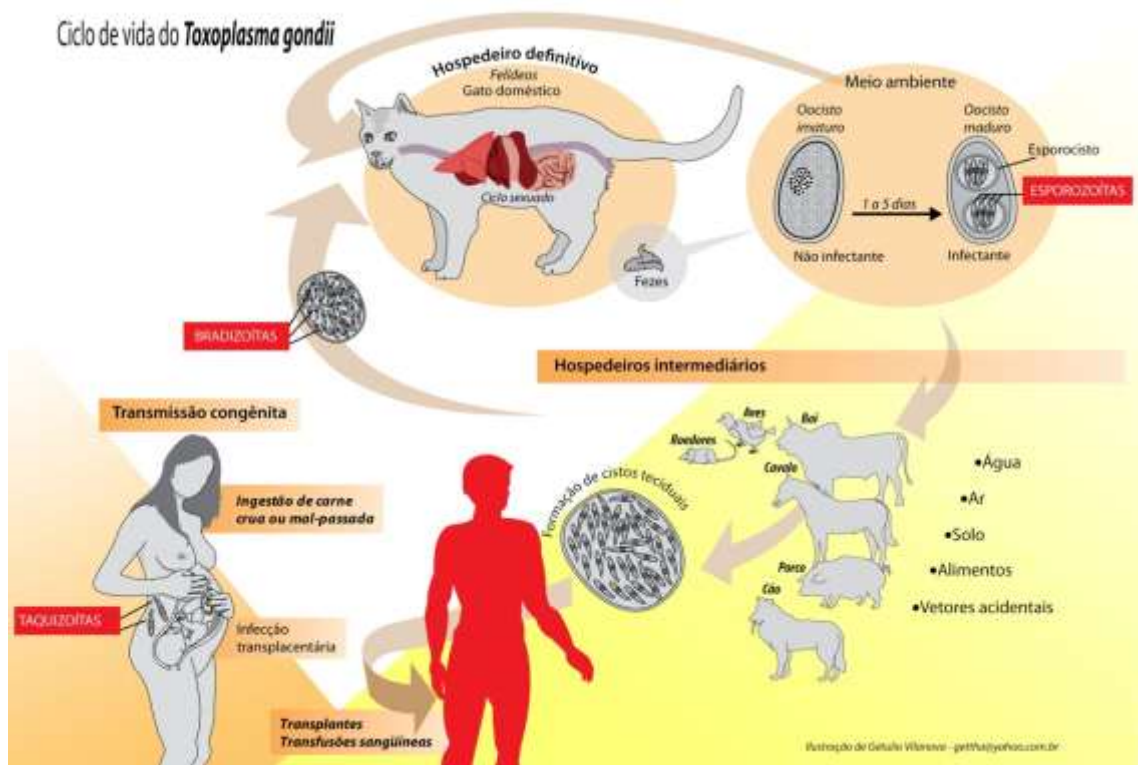


Figura 1.4. Esquema do ciclo de vida de *T. gondii* nos hospedeiros intermediários e definitivos. Moura *et al.* (2009).

1.4. CEPAS DE *T. GONDII*

T. gondii é classificado em três linhagens clonais predominantes, designadas tipos I, II e III, que foram isoladas da América do Norte e Europa. Embora sejam geneticamente muito semelhantes, possuem 1 a 2% de diferenças em seus nucleotídeos, bem como diferenças fenotípicas, que influenciam quanto ao seu crescimento, virulência e capacidade de formar cistos. Análises de polimorfismo apontam que as diferentes linhagens surgiram após um cruzamento genético, o que causou a sua expansão (Howe e Sibley, 1995; Su *et al.*, 2003; Sibley *et al.*, 2009). A linhagem tipo I cresce rapidamente e é altamente virulenta, levando à morte de camundongos em pouco tempo. Taquizoítos do tipo I são menos propensos a se converterem em bradizoítos, causando, frequentemente, doença aguda em seus hospedeiros. Sua cepa mais comumente utilizada em laboratórios é conhecida como RH, e acredita-se que tenha perdido a capacidade de formar cistos maduros devido à sua alta propagação *in vitro*. Desta forma, embora cresça rápido e seja fácil de ser manipulada geneticamente, a cepa RH não é a melhor escolha quando se quer estudar a cistogênese (Akins *et al.*, 2004; Sullivan e

Jeffers, 2012; Weiss e Kim, 2013). Outra característica de infecções causadas por parasitos da linhagem I é que se disseminam rapidamente, alcançando uma alta carga parasitária, mesmo com um inóculo inicial baixo (Mordue *et al.*, 2001). A linhagem do tipo II (ex. cepas Prugniaud e ME-49) possui virulência intermediária, baixa taxa de replicação, formando cistos *in vitro* e *in vivo*. É a linhagem mais frequentemente associada em casos de portadores HIV positivos e em infecções congênitas na América do Norte (Howe e Sibley, 1995; Howe *et al.*, 1997), além de ser a mais comum em casos clínicos de toxoplasmose humana (Howe *et al.*, 1997). A cepa ME-49 é a mais utilizada quando se quer obter cistos para experimentos, bem como investigar o processo de cistogênese (Dubey *et al.*, 1998; Guimarães *et al.*, 2008, 2009; De Muno *et al.*, 2014). A linhagem tipo III é considerada a de mais baixa virulência, de crescimento mais lento, e assim como a II, forma cistos, porém não é associada com toxoplasmose clínica em humanos (Sullivan e Jeffers, 2012; Knoll *et al.*, 2014).

Existem cepas que apresentam genótipos distintos, sendo denominadas cepas atípicas (Ajzenberg, 2010), que surgem a partir de cruzamento de duas cepas distintas durante o ciclo sexuado do parasito no intestino de felídeos infectados, dando origem a esporozoítos com um perfil genético diferenciado. Cepas atípicas diferem em virulência, prevalência, capacidade migratória no hospedeiro e na formação de cistos teciduais. Na América do Sul e África têm sido identificados vários genótipos atípicos, indicativo de que nestes continentes a replicação sexual do parasito ocorra com alta frequência quando comparada a qualquer outra parte do mundo (Flegr *et al.*, 2014). A alta diversidade genética de *T. gondii* já foi identificada no Brasil a partir de isolados de vários animais, tais como, galinhas (Dubey *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2016), gatos, cachorros (Pena *et al.*, 2008) e suínos destinados ao consumo humano (Frazão-Teixeira *et al.*, 2011).

1.5. CICLO INTRACELULAR

1.5.1 Ciclo lítico

O estabelecimento da infecção de células hospedeiras pelo *T. gondii* implica na penetração ativa do parasito que garanta o seu não reconhecimento no interior da célula, induzindo ao bloqueio da fusão fagolisossomal (Jones *et al.*, 1972; Mordue e Sibley, 1997; Yamamoto e Takeda, 2012). O processo de interação parasito-célula hospedeira se inicia pelo deslizamento do parasito e a sua adesão via proteínas de superfície do parasito, as SAGs

(“surface antigens”) e as SRSs (“SAG related surface antigens”) com moléculas da matriz extracelular como heparan sulfato e laminina (Blader e Saeji, 2009). Associado a este processo, organelas secretoras localizadas na região apical participam da adesão, invasão e manutenção do parasito no interior da célula. Os micronemas por meio de proteínas adesivas como, AMA1, as MICs e a M2AP interagem com componentes de superfície da célula hospedeira. Outras proteínas com domínio transmembrana fazem parte do glideossomo (inseridas na película para deslocamento do parasito), se conectam entre a célula hospedeira e a maquinaria interna do protozoário (Sheiner *et al.*, 2010; Tardieux e Baum, 2016). Proteínas secretadas pelas róprias tem participação ativa (RON-2, RON-4, RON-5 e RON-8) na invasão formando uma estrutura transitória, com constrição em torno do corpo do parasito, a junção móvel, que funciona como uma “peneira”, selecionando os componentes da membrana do hospedeiro que irão integrar a membrana do vacúolo parasitóforo (Alexander *et al.*, 2005; Besteiro *et al.*, 2011).

O processo de invasão envolve ainda, a membrana plasmática da célula hospedeira: invaginação e formação do vacúolo parasitóforo, no qual o parasito ficará abrigado e em ativa multiplicação intracelular (Shen e Sibley, 2012). Outra via de acesso do parasito à célula hospedeira é por fagocitose, confirmado por ensaios com dinasoro, um inibidor da via endocítica (Jones e Hirsch, 1972; Morisaki *et al.*, 1995; Guimarães *et al.*, 2008; Kirchhausen *et al.*, 2008; Caldas *et al.*, 2009).

Já no interior do vacúolo parasitóforo, proteínas secretadas pelas róprias (ROPs) são liberadas em sequência às RONS, migrando para a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), para o interior da célula hospedeira ou para o lúmen do vacúolo parasitóforo em formação (Boothroyd e Dubremetz, 2008). Concomitante, proteínas dos grânulos densos secretadas durante e após a invasão do parasito, permanecem solúveis no lúmen do VP ou tornam-se associadas à MVP ou à rede túbulovesicular (RTV), dentro do VP (Mercier *et al.*, 2002; Magno *et al.*, 2005; Vommaro *et al.*, 2014). Estas proteínas modificam o ambiente dentro do VP garantindo a sobrevivência e replicação do parasito, promovendo o transporte de íons, lipídios, carboidratos, ATP e aminoácidos (Peng *et al.*, 2011). Além disso, o *T. gondii* por meio da secreção de proteínas das róprias promove o recrutamento de outras estruturas da célula, tais como, mitocôndrias, retículo endoplasmático e corpúsculos lipídicos (Sinai *et al.*, 1997, 2001; Gomes *et al.*, 2014; Mota *et al.*, 2014). A hipótese mais aceita é que este recrutamento iria se favorecer da maquinaria energética da célula hospedeira, garantindo o seu

desenvolvimento intracelular e manutenção durante a fase crônica da infecção (Sinai e Joiner, 1997; Laliberté e Carruthers, 2008; Peng *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2014).

Após os vários ciclos de divisão celular, cerca de 48 h após a invasão, período que varia com a cepa, ocorre o egresso do parasito da célula hospedeira. Este processo se inicia com o aumento do influxo intracelular de cálcio (pela produção de ácido absísico pelos parasitos), fragmentação da RTV, extrusão do conóide, secreção de proteínas dos micronemas semelhantes às porinas, que se inserem na MVP, permeabilizando-a e facilitando o escape do parasito do VP (Kafsack *et al.*, 2009). No citoplasma, frente à membrana da célula hospedeira, também permeabilizada pela ação das porinas, *T. gondii* alcança o meio extracelular e está apto a invadir novas células, concluindo assim o ciclo lítico (Caldas *et al.*, 2010; Blackman e Carruthers, 2013).

1.5.2 Cistogênese

O ácido absísico parece ter um papel decisivo no destino intracelular do *T. gondii*. Assim, a sinalização de cálcio mediada por este ácido influencia diretamente no direcionamento para o ciclo lítico ou a cistogênese. Desta forma, experimentalmente tem se demonstrado que a inibição da produção do ácido absísico leva ao encistamento (Nagamune *et al.*, 2008).

Outro fator importante para o encistamento é a diferenciação de formas taquizoítas para bradizoítas de *T. gondii*, que permite a manutenção do parasito dentro do hospedeiro por um longo período, talvez pela vida inteira do hospedeiro (Frenkel, 1973; Weiss e Kim, 2011; Schlüter *et al.*, 2014).

Dada a importância do desenvolvimento de cistos teciduais como um dos principais mecanismos de persistência da infecção, diversos trabalhos têm desenvolvido métodos para melhor compreensão da diferenciação em bradizoítos, embora as bases moleculares para o desenvolvimento desta modificação ainda sejam pouco conhecidas (White *et al.*, 2014). A estágio conversão é associada com a regulação positiva e negativa de vários genes expressos em estágios específicos (Behnke *et al.*, 2008; Naguleswaran *et al.*, 2010) que codificam várias proteínas de superfície, proteínas de choque térmico, enzimas, em especial da via glicolítica,

proteínas secretoras/excretoras, proteínas da parede cística, fatores de transcrição, entre outros (Manger *et al.*, 1998; Radke *et al.*, 2005; Naguleswaran *et al.*, 2010).

Cepas de *T. gondii* avirulentas do tipo II (VEG, ME-49; Beverley, Prugniald e NTE), produzem cistos teciduais espontaneamente *in vitro* com mais frequência (Lindsay *et al.*, 1993; McHugh *et al.*, 1993; De Muno *et al.*, 2014) e em maior número quando comparadas às cepas virulentas do tipo I (cepa RH e BK) (Bohne *et al.*, 1994; Bohne *et al.*, 1999; Ferreira-da-Silva *et al.*, 2009b).

Alguns estudos sobre o estágio-conversão taquizoíta↔bradizoíta propõem que o tipo celular não influencia na formação de cistos teciduais (Lindsay *et al.*, 1991). Esta proposta é sustentada por resultados mostrados em vários estudos onde a interconversão pode ser induzida *in vitro* por mudanças na temperatura ou no pH do meio (Soete *et al.*, 1994), por citocinas pró-inflamatórias (Bohne *et al.*, 1994), ou deleção de nutrientes do meio (Fox *et al.*, 2004). Soete *et al.* (1994) detectaram antígenos específicos para bradizoítos (BAG-1) e formação de estruturas císticas em culturas celulares das linhagens Vero e HFF infectadas com *T. gondii* (cepa RH), quando submetidas a estresse físico e metabólico. Ferreira-da-Silva *et al.* (2009-a, -b) empregando células musculares esqueléticas sugeriram que fatores inerentes ao tipo celular possam ser determinantes na formação de cistos. As culturas primárias de células musculares esqueléticas foram infectadas com taquizoítos da cepa virulenta tipo I (RH) e verificou-se a conversão de taquizoíta para bradizoíta na ausência de estímulos exógenos de estresse. Além disso, linhagens de células musculares mostram ser mais eficientes na capacidade de interconversão quando comparadas às culturas de fibroblastos, reforçando a ideia de que o fenômeno de conversão do *T. gondii* está associado a outros fatores, como por exemplo, o microambiente celular onde a infecção se estabeleça (Ferreira-da-Silva *et al.*, 2008, 2009 -a, -b).

A descoberta de antígenos estágio-específico, e consequente produção de anticorpos contra esses antígenos, favoreceram os estudos da cistogênese *in vitro*, com cepas avirulentas (tipos II e III) (Weiss e Kim, 2011) e dos mecanismos de interconversão *in vitro* (Bohne *et al.*, 1993; Lindsay *et al.*, 1993; McHugh *et al.*, 1993; Soete *et al.*, 1993; Bohne *et al.*, 1994; Soete *et al.*, 1994; Gross *et al.*, 1996; Sahm *et al.*, 1997; Guimarães *et al.*, 2008; Ferreira-da-Silva *et al.*, 2008, 2009a; De Muno *et al.*, 2014; Garcia, 2016).

O emprego do anticorpo CC2 específico para parede cística possibilitou identificar cistos teciduais em cultura de astrócitos e de neurônios de tecido de feto humano, com a cepa ME-49 (Halonen *et al.*, 1996). *In vivo*, quando bradizoítos são inoculados em camundongos por qualquer via, o período mínimo para formação de cistos teciduais biologicamente funcionais é de 6 dias pós-infecção (Dubey e Frenkel, 1976). Outros ensaios *in vivo* demonstraram que todos os bradizoítos convertem para a forma taquizoíta 18 h pós-infecção e foram negativos para o antígeno BAG-5, que reconhece especificamente antígenos de bradizoítos, 48 h pós-infecção (Dubey, 1997). Weiss *et al.* (1995) usaram o anticorpo anti-BAG5 e observaram a formação de cistos três dias pós-inóculo de estágios bradizoítos da cepa ME49 em fibroblastos humanos. Estes autores sugerem que alguns bradizoítos formem cistos teciduais diretamente sem conversão transitória em taquizoíta, como também descrita por Guimarães *et al.* (2008, 2009), empregando células musculares esqueléticas. Weilhammer *et al.* (2012) ao demonstrarem a formação de cistos em fibroblastos HFF e células Vero *in vitro* descreveram a influência da célula hospedeira no processo de encistamento. Paredes-Santos *et al.* (2013) por sua vez, observaram que células epiteliais LLC-MK₂ após 4 dias de infecção com taquizoítos da cepa EGS formaram cistos de forma espontânea em maior quantidade quando comparadas com fibroblastos HSFS e linhagem de células da glia. Esses estudos corroboram com os de células epiteliais como produtores de cistos, sem qualquer manobra experimental (De Muno *et al.*, 2014).

1.6. ASTRÓCITOS

1.6.1 Biologia

O SNC é constituído por neurônios e células da glia, que incluem micróglia, oligodendrócitos e astrócitos, sendo os astrócitos o tipo celular mais abundante (Fields e Stevens-Graham, 2002). Durante muito tempo, os astrócitos foram conhecidos erroneamente como "cola" cerebral (glia é o termo grego para cola), além de serem considerados secundários aos neurônios em relação às funções no SNC. O termo astrócito foi usado pela primeira vez em 1839 por Michael von Lenhossek, devido à sua morfologia estrelada (Oberheim *et al.*, 2012; Kiray *et al.*, 2016). No século 19 estas células foram classificadas em astrócitos protoplasmáticos e fibrosos, o que ainda é válido até hoje. As diferenças entre os dois tipos celulares baseiam-se em sua morfologia e localização. Astrócitos protoplasmáticos

são encontrados distribuídos por toda a matéria cinza, são mais complexos, apresentando inúmeros processos ramificados, que originam ramificações mais finas, formando uma distribuição globóide. Astrócitos fibrosos são encontrados por toda a matéria branca, são menos complexos e possuem diversos processos longos, finos e não ramificados (Ramon e Cajal, 1909; Sofroniew e Vinters, 2010). Diferentes estudos neuroanatômicos revelaram que os processos dos dois tipos de astrócitos envolvem vasos sanguíneos, as ramificações dos astrócitos protoplasmáticos as sinapses, enquanto os processos dos astrócitos fibrosos envolvem os nós de Ranvier. Ambos formam junções do tipo gap entre astrócitos vizinhos (Peters *et al.*, 1991; Sofroniew e Vinters, 2010). Os astrócitos protoplasmáticos são o tipo celular mais abundante no córtex cerebral de seres humanos e roedores, porém em humanos são maiores, mais diversos e mais complexos (DeFelipe *et al.*, 2002; Oberheim *et al.*, 2009). Um dos principais filamentos intermediários de astrócitos, a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), se tornou o principal marcador para a identificação dessas células através de técnicas de imunohistoquímica (Eng *et al.*, 2000). De maneira geral, os astrócitos possuem formas espongiiformes, com diâmetros variando de 40-60 μm e volume de $\sim 6.6 \times 10^4 \mu\text{m}^3$, sendo que em torno de 90-95% de sua área é formada por processos e ramificações. Estima-se que apenas 15% do volume de um astrócito de roedor possa ser visualizado por marcação com GFAP, que incluem o corpo celular e os processos maiores (Bushong *et al.*, 2002; Ogata e Kosaka, 2002).

1.6.2 Funções

Um princípio em biologia afirma que forma e função estão intimamente relacionadas, portanto, em astrócitos, especialmente os protoplasmáticos, acredita-se que seus numerosos prolongamentos, que fazem conexões com vasos sanguíneos e sinapses, possam esclarecer um pouco de suas diversas funções (Kimelberg e Nedergaard, 2010). O posicionamento estratégico de astrócitos permite a captação de glicose dos vasos sanguíneos, suprindo diferentes elementos neurais (Sofroniew e Vinters, 2010). Pesquisas apontam que os astrócitos participam da regulação do fluxo sanguíneo ao produzirem e liberarem diversos mediadores moleculares, tais como óxido nítrico, ácido aracdônico e prostaglandinas, que causam vasodilatação e vasoconstrição no SNC (Gordon *et al.*, 2007; Iadecola e Nedergaard, 2007). Os astrócitos são importantes para o desenvolvimento e funcionamento de sinapses, pois regulam íons, fluídos e pH, além de captarem neurotransmissores, tais como, glutamato,

glicina e GABA, acumulados nas fendas sinápticas (Simard e Nedergaard, 2004; Sattler e Rothstein, 2006). Tais neurotransmissores são convertidos por enzimas em precursores e reciclados para novas transmissões sinápticas (Seifert *et al.*, 2006). Astrócitos ainda protegem os neurônios ao capturarem excesso de compostos tóxicos como amônia e glutamato, convertendo-os em glutamina, além de participarem da captação de metais pesados, como o chumbo (Struzynska *et al.*, 2001). Também são fontes de agentes neuroativos, como esteróides, eicosanóides, estradiol, progesterona, fatores de crescimento e diversos metabólitos com efeitos sobre a transmissão e modulação das sinapses (Martin, 1992; Garcia-Segura e Melcangi, 2006). O colesterol é um esteróide componente das membranas celulares, e no caso do SNC, é primordial à formação e manutenção da membrana da bainha de mielina que reveste os axônios neuronais, e como estas células não sintetizam colesterol eficientemente, obtêm dos astrócitos, que são estão entre as células que mais produzem colesterol (Siegel *et al.*, 1999; Nieweg *et al.*, 2009). Além disso, durante a neurogênese, os astrócitos auxiliam na migração e no desenvolvimento de axônios em desenvolvimento (Powell e Geller, 1999), eles expressam canais de sódio e potássio, regulando a sua concentração extracelular, mas diferente dos neurônios, não propagam potenciais de ação através de seus prolongamentos (Nedergaard *et al.*, 2003; Kimelberg e Nedergaard, 2010). Estas células não são consideradas fisiologicamente inertes, uma vez que exibem aumentos na concentração de cálcio intracelular, forma de excitabilidade astrocitária, sendo independente de influências de atividades neuronais (Charles *et al.*, 1991; Nett *et al.*, 2002). Acredita-se que este aumento de cálcio esteja relacionado com comunicações intercelulares entre astrócitos-neurônios e astrócitos-astrócitos (Sofroniew e Vinters, 2010).

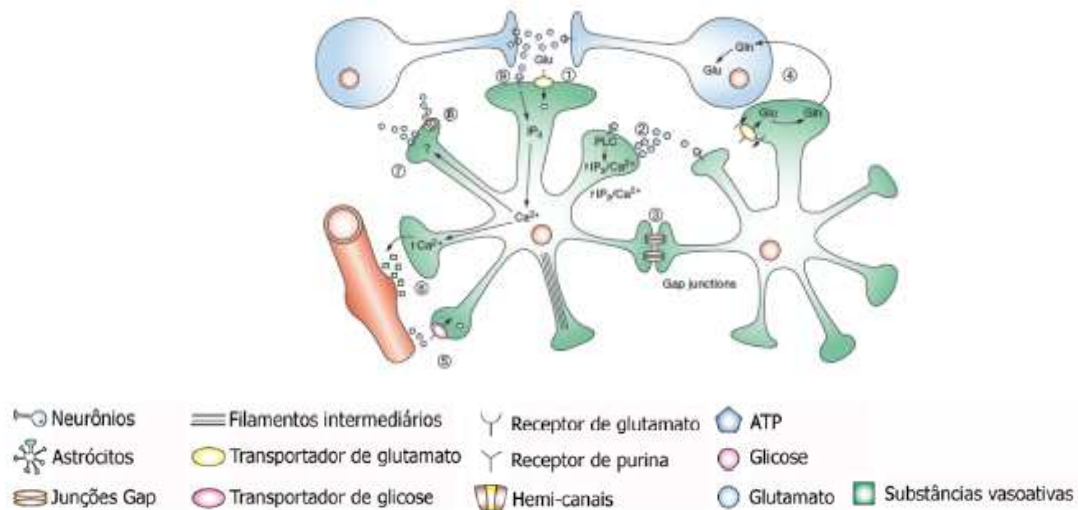


Figura 1.5. Esquema representativo de algumas funções dos astrócitos. (1) Modulação da função sináptica; (2) comunicação entre astrócitos, via liberação de ATP e sua ligação em receptores de purinas em astrócitos adjacentes com ativação de fosfolipase C, inositol trifosfato e mobilização de cálcio; (3) comunicação entre astrócitos, via junções gap para troca de moléculas pequenas; (4) realização do ciclo glutamato-glutamina, retirando glutamato da fenda sináptica e liberando glutamina para os neurônios; (5) transporte de glicose a partir da vasculatura; (6) regulação do fluxo sanguíneo mediada pela liberação de substâncias vasoativas; (7) liberação de glutamato pelo aumento de cálcio intracelular; (8) liberação de glutamato pelos hemi-canaís pela redução de cálcio intracelular; (9) ligação do glutamato a receptores metabotrópicos mobiliza o cálcio intracelular levando à liberação de substâncias vasodilatadoras. Gln: glutamina; Glu: glutamato; IP3: inositol trifosfato; PLC: fosfolipase C. Adaptado de Maragakis e Rothstein (2006).

1.6.3 Astrócitos e patologias do SNC

O SNC é propenso a lesões mecânicas e diversas doenças que desencadeiam respostas de diferentes células neuronais e não neuronais. A compreensão da contribuição destas células na progressão e no reparo de distúrbios cerebrais é de grande importância (Burda e Sofroniew, 2014). Neste contexto, sabe-se que os astrócitos possuem diversas funções homeostáticas no SNC saudável e debilitado, e podem assumir características fenotipicamente reativas diante de isquemia cerebral (redução do fluxo sanguíneo), traumas e doenças (Hol e Pekny, 2015). Estas células respondem a danos sofrendo alterações celulares, moleculares e funcionais, frequentemente denominadas astrogliose reativa (Khakh e Sofroniew, 2015). Dentre os elementos de astrócitos reativos que sofrem alterações na expressão de genes, estão as proteínas de filamentos intermediários vimentina e GFAP, sendo este último um conhecido marcador de astrogliose (Middeldorp e Hol, 2011; Hostenbach *et al.*, 2014). Morfologicamente, a astrogliose pode variar de leve à severa, sendo associada à formação de uma cicatriz glial (Sofroniew, 2005), que delimita o tecido com dano, protegendo o tecido saudável, um processo considerado importante para a recuperação da resistência do tecido

nervoso lesado (Ridet *et al.*, 1997). Acredita-se que estas alterações são formas de defesa que ajudam a equilibrar o estresse celular, contribuindo para a homeostase cerebral (Pekny e Pekna, 2014). Estudos utilizando modelos transgênicos com deleções apontam as funções benéficas que os astrócitos reativos exercem frente a danos no SNC, tais como reparo da barreira hematoencefálica, controle da disseminação de células inflamatórias e infecções, e que a perda ou diminuição dessa reatividade pode comprometer o tecido cerebral, como, por exemplo, levando à falha ou atenuação da captação de glutamato, o que pode ocasionar neurodegeneração excitotóxica (Rothstein *et al.*, 1996; Swanson *et al.*, 2004). Estudos utilizando camundongos nocautes para GFAP e vimentina mostraram que esses animais apresentavam formação da cicatriz glial prejudicada, perda sináptica após traumas (Pekny *et al.*, 1999) e uma menor resistência do tecido a estresses mecânicos (Pekny e Lane, 2007; Verardo *et al.*, 2008). Além disso, esses animais, quando submetidos à isquemia, sofreram mais infartos em relação aos animais selvagens (Li *et al.*, 2008). Astrócitos também podem ser alvos e responder a micro-organismos infecciosos, principalmente vírus, entretanto seus mecanismos de reatividade durante essas infecções estão apenas começando a ser elucidados (Sofroniew e Vinters, 2010). Sabe-se que astrócitos reativos formam um aglomerado ao redor de lesões causadas por parasitos e que modelos animais com deficiência em GFAP, apresentam menor capacidade de restringir danos causados pelo *T. gondii*, ocasionando um aumento da carga parasitária e de inflamação acentuada no tecido (Stenzel *et al.*, 2004). Estudos *in vitro* mostraram que astrócitos ativados por IFN- γ controlam a infecção pelo *T. gondii* via expressão de pequenas GTPases, e que camundongos nocautes para essas moléculas não conseguem controlar a infecção, o que ocasiona uma encefalite necrotizante. Apesar desses achados, os papéis imunoregulatórios de astrócitos frente à infecção por *T. gondii* ainda precisam de maiores esclarecimentos (Taylor *et al.*, 2000; Drögemüller *et al.*, 2008).

1.6.4 SNC e *T. gondii*

A compreensão das interações entre *T. gondii* e células do SNC vêm de estudos realizados com células murinas, *in vitro*. Assim como os humanos, camundongos são hospedeiros intermediários, onde a cistogênese prevalece principalmente no SNC (Remington e Cavanaugh, 1965; Dubey, 2010; Cabral *et al.*, 2016). Estudos prévios apontaram que o parasito é capaz de infectar tanto neurônios quanto astrócitos humanos e murinos (Halonen *et*

al., 1996; Fischer *et al.*, 1997a; Lüder *et al.*, 1999). De acordo com Ferguson e Hutchison (1987) e Melzer *et al.* (2010), parece existir uma exclusividade de persistência do parasito em neurônios *in vivo*. Dentre alternativas possíveis para a compreensão dessa divergência entre estudos *in vivo* e *in vitro* seria que neurônios e astrócitos sejam infectados por *T. gondii*, porém apenas os astrócitos possuem mecanismos capazes de debelar os parasitos, deixando os neurônios como principais células infectadas cronicamente. Sobre essa questão, alguns estudos preliminares *in vitro* estabeleceram que astrócitos, mas não neurônios, são capazes de utilizar GTPases reguladas pela citocina interferon-gama (IFN- γ) para eliminar 90% dos parasitos intracelulares (Cabral *et al.*, 2016). Um experimento realizado por Fischer *et al.* (1997a) com culturas mistas de células cerebrais identificou os tipos celulares suscetíveis à infecção e ao encistamento do parasito. Seus resultados indicaram que neurônios, microglias, astrócitos e oligodendrócitos foram infectados, mas os cistos só foram encontrados nos três primeiros tipos celulares. A interleucina 6 (IL-6) poderia ser um candidato a mediador imune, pois é secretada por astrócitos e microglias, e parece ser um fator importante para o encistamento *in vivo* (Suzuki *et al.*, 1994) e *in vitro* (Weiss *et al.*, 1995). De acordo com outros estudos conduzidos por Fischer *et al.* (1997b), os astrócitos possuem um papel imune importante contra *T. gondii* no SNC, pois são capazes de ativar e secretar diferentes citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α durante a infecção *in vitro*. A habilidade do *T. gondii* de infectar e se estabelecer em astrócitos *in vitro* tem sido comprovada (Daubener *et al.*, 1993; Peterson *et al.*, 1993; Pelloux *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 1997a), assim como *in vivo* (Ferguson *et al.*, 1989; Sims *et al.*, 1989; Deckert-Schluter *et al.*, 1999). As divergências em relação ao tipo celular mais suscetível à infecção bem como ao encistamento do parasito em astrócitos é proveniente principalmente da diversidade de modelos experimentais, como cepas (diferenças de virulência), espécies de hospedeiros, carga parasitária e os diferentes períodos de avaliação (Contreras-Ochoa *et al.*, 2012), constituindo dessa forma, um dos desafios desta dissertação.

1.7. CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

Os corpúsculos lipídicos (CL) foram considerados por muito tempo como meros reservatórios de lipídios, aumentando ou diminuindo de acordo com o requerimento de energia metabólica (Fujimoto e Parton, 2011; Welte, 2015). CL têm sido considerados como autênticas organelas, ricas em lipídios neutros, presentes em todos os tipos celulares eucarióticos (Murphy, 2001; Zhang *et al.*, 2010) e procarióticos, como em bactérias dos

gêneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Streptomyces* e *Acinetobacter* (Kalscheuer e Steinbuchel, 2003; Waltermann *et al.*, 2005). A biologia dos CL está somente começando a ser desvendada (Thiam *et al.*, 2013; Pol *et al.*, 2014; Gao e Goodman, 2015). São mais abundantes em células adiposas e produtoras de esteróides, mas podem ser encontrados em qualquer tipo celular. Apesar das variações entre os organismos, seus diferentes tipos celulares e funções, os CL apresentam a mesma arquitetura - um núcleo contendo lipídios neutros, com predominância de triacilgliceróis e ésteres de esteróis, circundados por uma monocamada de fosfolipídios anfipáticos e proteínas associadas (Murphy, 2001; Tauchi-Sato *et al.*, 2002). Esta monocamada, característica única dessas organelas, facilita a sua visualização através da microscopia eletrônica de transmissão (MET), em comparação a outras organelas intracelulares (Melo *et al.*, 2006). CL são estruturas esféricas, e em adipócitos, um grande corpúsculo pode alcançar até 200 μm de diâmetro, ocupando quase todo o citoplasma da célula em condições de excesso de lipídios. Em outros tipos celulares essas estruturas variam de tamanho, em média de 0,1 a 5 μm de diâmetro, distribuídas pelo citoplasma. (Tauchi-Sato *et al.*, 2002; Saka e Valdivia, 2012). Dependendo do tipo celular e sua função, os lipídios neutros presentes no núcleo dos corpúsculos podem variar, assim como as proteínas presentes na monocamada lipídica. Em adipócitos os triacilgliceróis são mais abundantes, já em outros tipos celulares, como macrófagos, os ésteres de esteróis predominam, enquanto em leveduras, ambos triacilgliceróis e ésteres de esteróis ocorrem na mesma razão (Leber *et al.*, 1994; Bartz *et al.*, 2007; Walther e Farese, 2009). A biogênese de CL normalmente é dependente de membrana; em procariotos são sintetizados a partir da membrana celular (Waltermann *et al.*, 2005), enquanto em eucariotos, existem algumas hipóteses, sendo a mais aceita a de que retículo endoplasmático seja seu sítio de formação (Meester *et al.*, 2011; Pol *et al.*, 2014), uma vez que muitas enzimas necessárias para a biossíntese de triacilgliceróis e fosfolipídios, assim como para a esterificação de esteróis estão presentes nessa organela (Murphy, 2001). Outros aspectos relevantes envolvem a composição lipídica da monocamada dos corpúsculos que é semelhante àquela encontrada no retículo, além de frequentemente, serem encontrados muito próximos à membrana reticular (Tauchi-Sato *et al.*, 2002; Ozeki *et al.*, 2005, Robenek *et al.*, 2006; Bartz *et al.*, 2007). Segundo esse modelo de biogênese, lipídios neutros seriam sintetizados entre regiões específicas da bicamada lipídica do retículo endoplasmático liso, e então, quando maduros, brotariam da bicamada para se tornarem organelas independentes, porém muitos aspectos desta biogênese permanecem ainda não claros (Martin e Parton, 2006; Ploegh, 2007; Kalantari *et al.*, 2010;

Wilfling *et al.*, 2014). Outras funções dos CLs incluem o metabolismo de lipídios e homeostase de energia, uma vez que aumentam seu tamanho e número quando há excesso de lipídios, prevenindo a lipotoxicidade (Listenberger *et al.*, 2003), além de serem utilizados quando outras fontes de carbono estão em falta e há necessidade de suprimento energético (Masuda *et al.*, 2006), e fornecerem lipídios para a síntese de componentes de membrana e para sinalização celular. Recentes descobertas apontam a existência de CL no núcleo, havendo evidências de que estejam envolvidos no metabolismo lipídico nuclear e que os corpúsculos citoplasmáticos possam servir como reservatórios de histonas (Welte, 2015; Ohsaki *et al.*, 2016; Farese e Walther, 2016). Nos últimos anos, CL têm sido apontados como organelas importantes no ciclo de vida de uma ampla gama de patógenos intracelulares, e podem agir como mediadores de respostas imunes (Saka e Valdivia, 2012).

1.7.1 CL e patógenos

Nos últimos anos, diversas funções dos CL em processos biológicos vêm sendo reveladas. Em relação ao sistema imune, sabe-se que são sítios de síntese de moléculas sinalizadoras importantes para a inflamação, eicosanóides e atuam na defesa contra o câncer e diversos patógenos (Bozza *et al.*, 2009, 2011). Muitos estudos se referem à presença desta organela com aumento da produção de mediadores inflamatórios (Pacheco *et al.*, 2002, D'Avila *et al.*, 2006) tais como, prostaglandina E2 (PGE2) (Bozza *et al.*, 2011). No entanto, alguns patógenos conseguem escapar do sistema imune, e os CLs são alvos desses organismos, dos quais obtêm lipídios como substrato energético, garantindo sua sobrevivência e multiplicação na célula hospedeira (van der Meer-Janssen *et al.*, 2010; Welte, 2015). Dentre esses patógenos estão diversos vírus, bactérias intracelulares e protozoários (Saka e Valdivia, 2012). Apesar das células conterem CL fisiologicamente, a interação com patógenos pode acarretar em alterações estruturais dessas organelas, como aumento em seu número e tamanho. Essas modificações frente a infecções podem acontecer *in vivo* e *in vitro* (Melo e Dvorak, 2012; Gomes *et al.*, 2014). Em relação aos protozoários, sabe-se que muitos possuem uma natureza intracelular obrigatória, e quando infectam uma célula hospedeira, são internalizados dentro de um vacúolo derivado de membrana, o vacúolo parasitóforo (VP), onde se proliferam e sobrevivem (Sibley, 2011). O primeiro relato da interação entre a biogênese de CL e uma infecção por protozoário ocorreu em 2003, quando foi observado um aumento dessas organelas em macrófagos de ratos infectados com *Trypanosoma cruzi* (Melo

et al., 2003). Posteriormente, outros estudos com diferentes protozoários como *Leishmania amazonensis* (Pinheiro *et al.*, 2009; Lecoeur *et al.*, 2013), *Leishmania major* (Rabhi *et al.*, 2016), *Plasmodium berghei* (Pulido-Méndez *et al.*, 2006) e *Toxoplasma gondii* (Charron e Sibley, 2002; Gomes *et al.*, 2014) também demonstraram aumento semelhante da organela da célula hospedeira, bem como um íntimo contato com o vacúolo parasitóforo, indicando que os patógenos poderiam estar explorando estas organelas para seu benefício. Análises feitas por MET comprovam a associação entre os corpúsculos e o VP (Gomes *et al.*, 2014; Toledo *et al.*, 2016).

1.8. TOXOPLASMOSE

O primeiro caso de toxoplasmose congênita humana foi descrito em 1923 por Jankú, um oftalmologista tchecoslováquio, em uma criança de 11 meses cega, que apresentava hidrocefalia e que morreu pouco tempo depois. Na autópsia foram identificadas em um dos olhos estruturas semelhantes a cistos, as quais Jankú denominou de "esporocistos". Na época o médico acreditava que o parasito se tratava de *Encephalitozoon* (um microsporídeo). Apesar da descrição dos sintomas apontarem para toxoplasmose, análises conclusivas desse caso não puderam ser realizadas porque o material foi perdido em um bombardeamento durante a Segunda Guerra Mundial (Weiss & Kim, 2007). Em 1938 foi descrito o primeiro caso conclusivo de toxoplasmose em uma criança recém-nascida nos Estados Unidos, que veio a óbito com 1 mês de vida. A autópsia confirmou a presença de *T. gondii* no olho direito, medula espinhal e cérebro.

Em 1942, Sabin propôs os sinais típicos para o reconhecimento da toxoplasmose congênita: hidrocefalia, microcefalia, calcificações intracerebrais e corioretinite. Em adultos, o primeiro caso identificado foi no Peru, em 1937, quando Pinkerton e Weinman observaram *T. gondii* no coração, baço e em outros órgãos de um jovem de 22 anos (Weiss e Kim, 2007).

Toxoplasmose é uma das zoonoses parasíticas mais comuns em humanos e animais de sangue quente. Tem sido relatada em praticamente qualquer mamífero e em diversas espécies de pássaros. Era uma infecção pouco compreendida até o surgimento da epidemia do HIV (Hill *et al.*, 2005; Sukthana, 2006). Estima-se que em torno de 25 a 30% da população humana no mundo todo esteja infectada pelo *T. gondii*. No entanto, a incidência varia muito entre os países (10 a 80%), entre diferentes regiões de um mesmo país e entre regiões do globo, sendo que a América do Norte, Sudeste Asiático, Norte da Europa e países sahelianos

da África, apresentam uma baixa soroprevalência (10 a 30%). Incidência moderada é observada em países da Europa Central e do Sul, e alta incidência na América Latina e países tropicais da África (Pappas *et al.*, 2009; Robert-Gangneux *et al.*, 2012).

Diversos fatores podem afetar a soroprevalência da toxoplasmose em humanos. A sobrevivência de oocistos no ambiente está relacionada a fatores climáticos e isso pode contribuir para o aumento da infecção em animais produtores de carne, que são consumidos por humanos. Países tropicais, com clima úmido e quente apresentam alta incidência, ao contrário de países com clima frio ou árido. Outros fatores também influenciam na variação da incidência da toxoplasmose, que incluem hábitos alimentares e sanitários, como tipo de carne e vegetais consumidos, método de cozinhar, lavagem das mãos e dos alimentos, qualidade da água consumida, e ainda, fatores sócioeconômicos e hábitos culturais. A soroprevalência aumenta com a idade do indivíduo, mas isso está diretamente relacionado ao país e a níveis socioeconômicos. Crianças que vivem em ambientes pobres de higiene apresentam alta probabilidade de se contaminarem (Robert -Gangneux *et al.*, 2012).

Embora a infecção por *T. gondii* em humanos seja muito comum, os sintomas clínicos costumam ser restritos a alguns grupos de risco. Em indivíduos imunocompetentes a doença é frequentemente assintomática, embora sintomas leves como linfadenopatia possam ocorrer. Manifestações mais graves são raras em imunocompetentes, e incluem miocardite, encefalite ou hepatite (Ho-Yen, 1992; Tenter *et al.*, 2000). A transmissão vertical ocorre quando uma mulher grávida se infecta, sendo os danos para o feto diretamente relacionados com o estágio da gravidez no qual a mãe se infectou. Infecções adquiridas no primeiro trimestre costumam ser mais graves em relação às do segundo e terceiro. Podem ocorrer abortos, morte neonatal ou ainda anormalidades fetais com consequências graves para o feto (Desmonts e Couvreur, 1974; Hill *et al.*, 2005). As manifestações clínicas em crianças infectadas congenitamente variam muito, e incluem problemas cerebrais como microcefalia, hidrocefalia, calcificações cerebrais, epilepsia, retardo mental e psicomotor; doenças oculares como retinocoroidite, estrabismo e cegueira, dentre outras sequelas (Swisher *et al.*, 1994; Montoya e Liesenfeld, 2004). Em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles recebendo terapias imunossupressoras com corticosteróides e drogas citotóxicas, doadores e receptores de órgãos e medula óssea e portadores da síndrome da imunodeficiência humana (HIV), a toxoplasmose pode ser um risco de vida. Nesses casos, pode ocorrer a reativação de uma infecção prévia pelo *T. gondii*, resultando em encefalite, pneumonite, miocardite, que se não tratadas, podem

ser fatais (Remington, 1974; Weiss e Dubey, 2009). Em pacientes com HIV, as principais manifestações da toxoplasmose são de ordem neurológica, sendo a encefalite a mais comum. Achados clínicos incluem febre, dores de cabeça, fraqueza, convulsões, estado mental e sensorial alterados e distúrbios de movimento e dos nervos cranianos (Luft e Remington, 1992; Weiss e Dubey, 2009). Pessoas acometidas pela encefalite podem apresentar ainda transtornos neuropsiquiátricos, como ansiedade, demência, psicose e transtornos de personalidade (Ko *et al.*, 1980; Basavaraju, 2016).

II. JUSTIFICATIVA

Os mecanismos que regem a diferenciação de *T. gondii* em astrócitos e as lacunas no conhecimento da resposta celular à sua infecção direcionaram os objetivos desta dissertação que serão apresentados a seguir. Além disso, a alta diversidade de metodologias nos ensaios de interação de *T. gondii* e astrócitos e a dificuldade de análises comparativas justificam o desenvolvimento deste trabalho. Nossa contribuição neste estudo foi a análise cinética da infecção de astrócitos frente a duas cepas polares de *T. gondii*, análise ultraestrutural e a migração de CL durante essa interação, ainda não explorada neste tipo celular.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL: Estudar aspectos da resposta celular de astrócitos de murinos frente à infecção pelo *Toxoplasma gondii*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Estudar a cinética da infecção e o estabelecimento da cistogênese em culturas primárias de astrócitos murinos da linhagem Swiss Webster frente a cepas polares de *T. gondii*;
- 2) Analisar ultraestruturalmente os eventos intracelulares de astrócitos decorrentes da sua interação com *T. gondii*;
- 3) Avaliar o envolvimento de corpúsculos lipídicos durante a infecção de *T. gondii* em astrócitos;
- 4) Avaliar a participação de filamentos intermediários de astrócitos durante o desenvolvimento intracelular de *T. gondii*.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS CORTICAIS MURINOS

4.1.1 Isolamento e plaqueamento de células corticais mistas

O isolamento de células corticais mistas para a obtenção de astrócitos foi realizado utilizando-se camundongos neonatos (P0-P1) da linhagem “Swiss Webster”, fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil).

De acordo com o protocolo adaptado de Schildge *et al.* (2013). Etapas do processamento:

- Os animais foram eutanasiados e seus cérebros coletados e colocados em placas de 60 mm em solução de salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) contendo solução de penicilina/estreptomicina (GIBCO), sobre o gelo.

- Com o auxílio de um microscópio estereoscópio foram retirados o tronco encefálico, cerebelo e os bulbos olfatórios e então, os hemisférios cerebrais foram divididos ao meio. A massa branca foi retirada, deixando apenas o córtex, camada mais externa do cérebro. As meninges foram retiradas delicadamente para evitar contaminação com outros tipos celulares.

- Os córtices foram isolados e fragmentados com uma lâmina cirúrgica, e então dissociados com solução contendo 0,05% de Tripsina (Sigma-Aldrich) e 0,01% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Sigma-Aldrich) (diluídos na proporção de 1:3 em solução de PBS).

- O tecido permaneceu nesta solução por 5 min em estufa a 37°C com atmosfera de 5% CO₂ e, em seguida, foi homogeneizado delicadamente várias vezes com pipeta Pasteur para auxiliar na melhor dissociação das células.

- Após dissociação, foi adicionado meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM/Hams F12 - Sigma-Aldrich) com 10% SFB (Cultilab) a 4°C para inibir a ação da tripsina. A solução contendo as células dissociadas foi centrifugada a 1.200 RPM por 10 min e o sobrenadante foi descartado.

- O sedimento contendo as células foi ressuspensão em meio DMEM-F12 suplementado com 10% SFB ,1% antibiótico e 1% Glutamax[®] (Thermo-Fisher).

- As células foram homogeneizadas no meio de cultura, distribuídas na densidade celular de 20-30 x 10⁶ em garrafas de cultura T75 (Corning), incubadas em estufa a 37°C com 5% CO₂ por 2 dias, seguida da lavagem com PBS e troca de meio a cada quatro dias.

4.1.2 Obtenção de uma cultura rica em astrócitos

Para enriquecimento da cultura de astrócitos, seguiu-se o método descrito em Schildge *et al.* (2013):

- Após 7-8 dias de cultivo, as garrafas foram colocadas em um agitador a 180 RPM por 30 min a 37°C visando o desprendimento de células das microglias. O meio foi trocado, e então as garrafas voltaram para o agitador para uma nova agitação a 240 RPM por no mínimo 2 h a 37°C para a liberação de oligodendrócitos das culturas.

- A fim de obter culturas ricas em astrócitos, batidas foram aplicadas no fundo das garrafas para um maior desprendimento de progenitores de oligodendrócitos.

- As células dissociadas com tripsina foram incubadas com 0,4% de azul de tripano, uma substância que fica retida no interior de células mortas, devido à alteração da integridade da membrana, permitindo assim, uma quantificação somente de células vivas.

- A quantificação das células foi feita em câmara de Neubauer e o número de células calculado levando-se em consideração as diluições e o volume da câmara.

- As células então foram plaqueadas em garrafas cerca de 1x10⁶ por T75 por mais 10-12 dias, para que os astrócitos estivessem maduros para a realização dos experimentos.

O enriquecimento da cultura foi avaliado por imunofluorescência para GFAP (marcador de astrócitos) com base na razão entre o número total de células na cultura e as marcadas com GFAP.

4.2 CULTURA DA LINHAGEM CELULAR EPITELIAL RENAL (VERO)

Células da linhagem Vero, oriundas do epitélio distal normal do córtex renal de macaco verde (ATCC[®] CCL-81[™]), foram semeadas na concentração de $1,0 \times 10^5$ /mL em garrafas de cultura celular de 25 cm² (Gibco, Reino Unido), em meio DMEM F12, suplementado com 1% solução antibiótica e 10% SFB. As células foram mantidas em estufa com atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. A cada dois dias, o meio foi descartado e o mesmo volume de meio fresco adicionado até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Para o subcultivo, as células foram incubadas em solução de dissociação contendo PBS suplementado com 0,01% de EDTA e 0,25% de tripsina durante 5 min a 37°C. Após dissociação, à suspensão celular foi adicionado meio DMEM/F12 com 10% SFB a 4°C para inibir a ação da tripsina e centrifugada durante 7 min a 174 g à mesma temperatura. Após a centrifugação, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e mantidas semiconfluentes em garrafas de 25 cm³ (1×10^6 células/garrafa), sendo o meio trocado a cada 2 dias. A viabilidade das células foi avaliada por coloração com azul de tripan como previamente descrito, e apenas as culturas que continham células com viabilidade maior que 95% utilizadas nos experimentos.

4.3 OBTENÇÃO DE PARASITOS E INTERAÇÃO PARASITO-CÉLULA

Taquizoítos da cepa avirulenta tipo II (ME-49 - gentilmente cedida pelo Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli (Laboratório de Imunopatologia, Instituto René Rachou, Belo Horizonte, MG, Brasil) e virulenta (RH) de *T. gondii*, foram obtidos de culturas de células Vero, previamente infectadas na relação parasito-célula hospedeira de 3:1. Para obtenção de taquizoítos da cepa ME-49, cerca de 4-8 semanas, após a infecção de camundongos da linhagem C57BL/6 com 30 cistos, por via intraperitoneal, os cérebros destes animais foram coletados, os cistos purificados e rompidos para obtenção de formas bradizoítos (Guimarães *et al.*, 2008). Esses parasitos, então, serviram de fonte de infecção primária de células Vero. Assim, a partir da infecção das culturas com bradizoítos, cerca de 5 a 7 dias pós-infecção, os taquizoítos foram recolhidos do sobrenadante e utilizados em ensaios subsequentes. Para

obtenção de taquizoítos da cepa RH, camundongos da linhagem Swiss Webster foram infectados intraperitonealmente com 10^4 taquizoítos, e cerca de 2-3 dias pós-infecção, foram recolhidos do peritônio. Assim, os taquizoítos desta cepa, provenientes da infecção *in vivo* foram a fonte de infecção primária de células Vero, e cerca de 2 a 5 dias pós-infecção, foram recolhidos do sobrenadante a partir da centrifugação diferencial (180 g por 7 min, seguida 1500 g por 10 min) e transferidos para uma nova cultura para a manutenção da forma evolutiva ou utilizados nos ensaios.

4.4 ENSAIOS DE INFECTIVIDADE

Os astrócitos purificados foram semeados em placas de 24 poços ou placas de 60 mm e após 48h de cultivo, foram infectados com taquizoítos da cepa ME-49 de *T. gondii*, nas relações parasito-célula hospedeira 1:1 e 5:1, e com a cepa RH nas relações 1:1 e 3:1. Após 2h de interação, as culturas foram lavadas com PBS e mantidas interagindo com o parasito por períodos de 24-144h, sendo lavadas com PBS e tendo o meio trocado todos os dias.

4.5 DETERMINAÇÃO DA INFECÇÃO DE ASTRÓCITOS PELO *T. GONDII* POR MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

Conforme descrito no item 4.4, culturas de astrócitos infectadas nas diferentes condições experimentais foram fixadas por 5 min com solução de Bouin nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h, seguida por 3 lavagens com 70% etanol. Para a coloração, o etanol foi retirado e as culturas lavadas em água destilada. O corante Giemsa foi filtrado com papel filtro, diluído 1:10 em água destilada e adicionado às culturas por 80 min. As lamínulas foram então lavadas em água destilada para remoção do excesso de corante e desidratadas em bateria que consistiu em: 100% acetona (2x), 70% acetona/ 30% xilol, 50% acetona/ 50% xilol, 30% acetona/ 70% xilol e 100% xilol (2x). Por fim, as lâminas foram montadas em meio de montagem Permout[®] (Fischer Scientific).

Para determinação da infecção, um total de 300 astrócitos foi quantificado por lamínula (duplicata por ensaio biológico) no microscópio óptico Imager A2 (Zeiss), sendo avaliados os parâmetros: (a) o percentual de células infectadas; (b) o percentual de vacúolos por células

infectadas; (c) o número de parasitos por vacúolo parasitóforo, a fim de determinar a susceptibilidade de infecção e a proliferação dos parasitos no curso temporal da infecção.

4.6 ANÁLISES CITOQUÍMICAS E IMUNOCITOQUÍMICAS

As células controle e infectadas foram lavadas com PBS e fixadas nos tempos programados com solução de 4% paraformaldeído por 5 min, seguida por novas lavagens com PBS, e subsequentes abordagens que serão descritas a seguir.

4.6.1 Revelação de corpúsculos lipídicos (CL)

Para revelação de lipídios neutros acumulados em CL, as células foram incubadas inicialmente com os corantes BODIPY-493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4bora-3a,4a-diaza-s-indaceno) e "Nile Red" (Vermelho do Nilo), diluição 1:20.000 por 10 min. Após a lavagem em PBS por 5 min, as culturas foram incubadas por 5 min com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich), diluição 1:5.000, novamente lavadas por 5 min, e então montadas em lâmina em 2,5% DABCO (1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano-trietilenodiamina, Sigma-Aldrich). As células foram examinadas com microscópio de fluorescência Imager A2.

4.6.2 Revelação de GFAP ("Glial Fibrillary Acidic Protein")

As culturas fixadas foram lavadas com PBS, permeabilizadas com 0,5% Triton x-100 (Sigma-Aldrich), incubadas com solução 3% albumina bovina sérica (BSA) e incubadas com anticorpo primário contra GFAP feito em coelho (ABCAM) (diluição 1:400), seguido por lavagens em PBS + 1% BSA. Em sequência, as células foram incubadas com anticorpo secundário contra IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 488, Thermo Fisher) por 1 h a 37°C, na diluição de 1:2.000. Após lavagem, as culturas foram incubadas com DAPI, e examinadas como descrito anteriormente.

4.6.3 Monitoramento dos estágios evolutivos de *T. gondii*

Inicialmente, as células fixadas, foram permeabilizadas com PBS contendo 0,05% Triton X-100 (Roche) e 4% BSA (Sigma-Aldrich) por 20 min. Para identificação de taquizoítos, as culturas foram incubadas por 1 h a 37°C com anticorpo primário contra p30 (Santa Cruz, Dallas, EUA) diluído 1:100. Este anticorpo reconhece especificamente a proteína SAG1, encontrada na superfície externa da membrana plasmática deste estágio. Em seguida, as células foram lavadas com PBS contendo 4% BSA e reincubadas por 1 h a 37°C com anticorpo secundário (IgG contra camundongo conjugado com FITC) na diluição de 1:600. Para identificação de cistos, as culturas foram incubadas com a lectina aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA) conjugada a TRITC (Vector Laboratories), diluída 1:1000 por 30 min. Esta lectina se liga especificamente a grupamentos N-acetil-galactosamina presentes na parede cística (Zhang *et al.*, 2001). Após lavagem, as culturas foram incubadas com DAPI por 5 min. Os controles das reações foram realizados na ausência do anticorpo primário, e para a lectina DBA foi realizado um ensaio de competição com a adição de 50 mM N-acetil-galactosamina (GalNAc).

4.7 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Culturas de células controle e infectadas após 24 a 144 h de interação foram lavadas 2x com PBS e fixadas durante 1 h a 4°C com 2,5% glutaraldeído diluído em 0,1 M tampão cacodilato de sódio contendo 3,5% de sacarose e 2,5 mM de CaCl₂ (pH 7,2). As células foram lavadas em no mesmo tampão, pós-fixadas com 1% tetróxido de ósmio a 4°C por 1 h. Após novas lavagens, as células foram destacadas do substrato com um raspador de células (“rubber policeman”) a 4°C e centrifugadas a 10,000g por 5 min. O material em suspensão foi desidratado em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100% 3x), 10 min cada etapa. O material foi incluído em resina epóxi (PolyBed® 812 – Polysciences) em acetona 100% (3:1; 1:1, 1:3), cada etapa *overnight*, emblocado em resina pura por 72 h a 60°C para polimerização da resina. Cortes ultrafinos foram obtidos e recolhidos em grades de cobre, contrastados em acetato de uranila e citrato chumbo para análise ao microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 (Jeol) da Plataforma Rudolf Barth de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz.

4.8 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os experimentos envolvendo animais foram executados de acordo com as orientações estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-Fiocruz) licença LW-50/14 e L0-48/2015 e sob as regras internacionais de cuidados na manipulação de animais e agentes patogênicos (“Guidelines on the Care and Use of Animals for Experimental Purposes and Infectious Agents/NACLAR”).

V. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE ASTRÓCITOS MURINOS

As células foram colhidas do córtex cerebral, eliminando-se a substância branca, e cultivando os astrócitos protoplasmáticos localizados na substância cinzenta. A caracterização do fenótipo dos astrócitos purificados foi estabelecida por critérios morfológicos analisados por microscopia óptica de culturas vivas e coradas pelo Giemsa, por imunocitoquímica utilizando marcador específico de astrócitos (GFAP-FITC) e por microscopia eletrônica de transmissão. A análise das culturas durante os 12 primeiros dias de cultivo mostrou baixa capacidade proliferativa celular no primeiro plaqueamento. A partir desse período, as subculturas adquiriram boa atividade multiplicativa como podem ser observadas vivas por microscopia de contraste de fase com 96 h de cultivo (Fig. 5.1 A-B). As células apresentam citoplasma volumoso, prolongamentos citoplasmáticos numerosos e curtos. A morfologia dessas culturas de astrócitos aponta células de grande volume, muito irregulares, nem sempre estreladas como sugere sua denominação, adquirindo muitas vezes, o padrão poliédrico (Fig. 5.1 A-C). Quando as culturas foram coradas pelo Giemsa mostraram o núcleo grande, cromatina frouxa e nucléolo muitas vezes central (Fig. 5.1 C-D). O emprego de Vermelho do Nilo e Bodipy permitiram a observação da distribuição de CL em astrócitos (Fig. 5.1 E-F); A técnica de imunocitoquímica confirmou a presença de GFAP, marcador de astrócitos. As imagens de microscopia de fluorescência mostram dois tipos de marcação de astrócitos: (a) distribuição desses filamentos no citoplasma formando uma malha densa em rede com marcação bastante intensa e com maior concentração na região perinuclear e nas projeções citoplasmáticas (Fig. 5.1 G); (b) marcação perinuclear e predominante nos prolongamentos citoplasmáticos (Fig. 5.1 H). A caracterização ultraestrutural dos astrócitos confirmou os dados da microscopia de luz, onde células de grande volume, com formas muito irregulares, prolongamentos numerosos e curtos foram observadas (Fig. 5.2 A-B). Com esta técnica, detectamos ainda, inúmeras mitocôndrias, núcleos volumosos com baixa eletrondensidade, além da presença de interdigitações e revestimento fino de heterocromatina sob o envelope nuclear (Fig. 5.2 A-B). O retículo endoplasmático rugoso consiste de cisternas isoladas e

curtas e Golgi constituído de poucas cisternas com maior incidência próximos ao núcleo (Fig. 5.2 B).

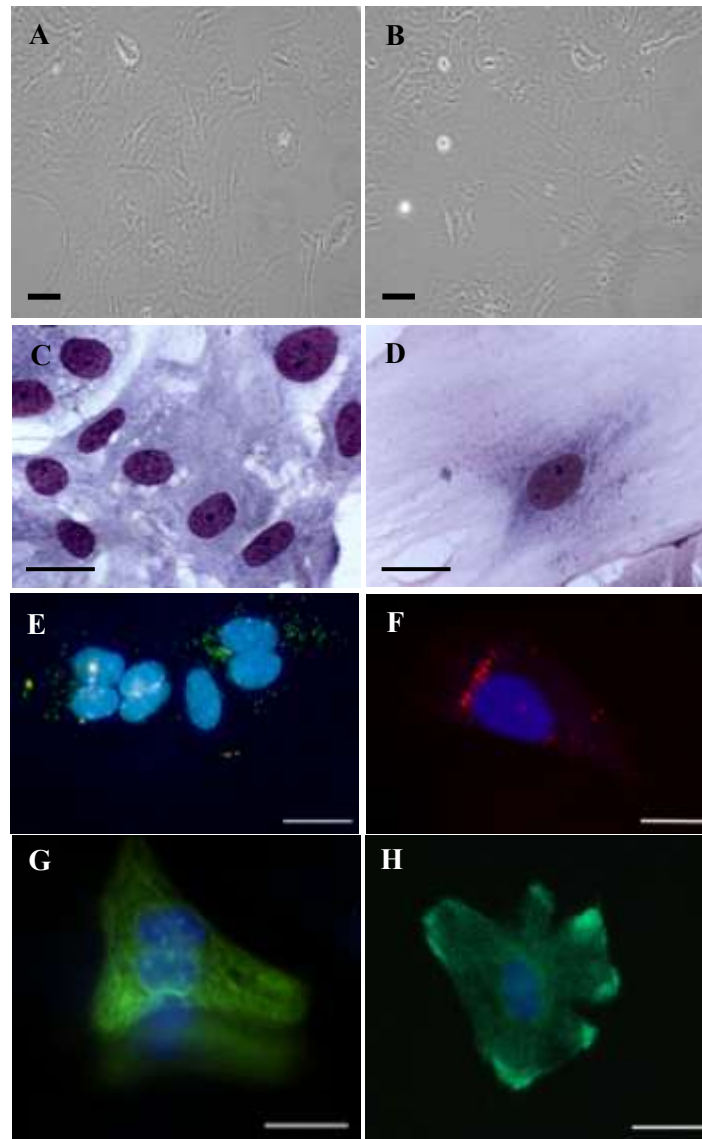


Figura 5.1 – Aspectos morfológicos da cultura primária de astrócitos com 96 h de cultivo. Células com citoplasma volumoso, prolongamentos citoplasmáticos numerosos, núcleo grande e nucléolo central por microscopia de contraste de fase (A e B) e coradas por Giemsa com 72 h de cultivo (C e D). Corpúsculos lipídicos revelados por Bodipy e Vermelho do Nilo, respectivamente, com 72 h (E e F). Imunofluorescência de filamentos intermediários marcados com anticorpo contra GFAP (verde) formando uma malha densa em rede na região perinuclear e nas projeções citoplasmáticas com 96 h (G) ou marcação perinuclear e predominante nos prolongamentos citoplasmáticos com 96 h de cultivo (H). Barras: 10 μm (A e B), 20 μm (C-F).

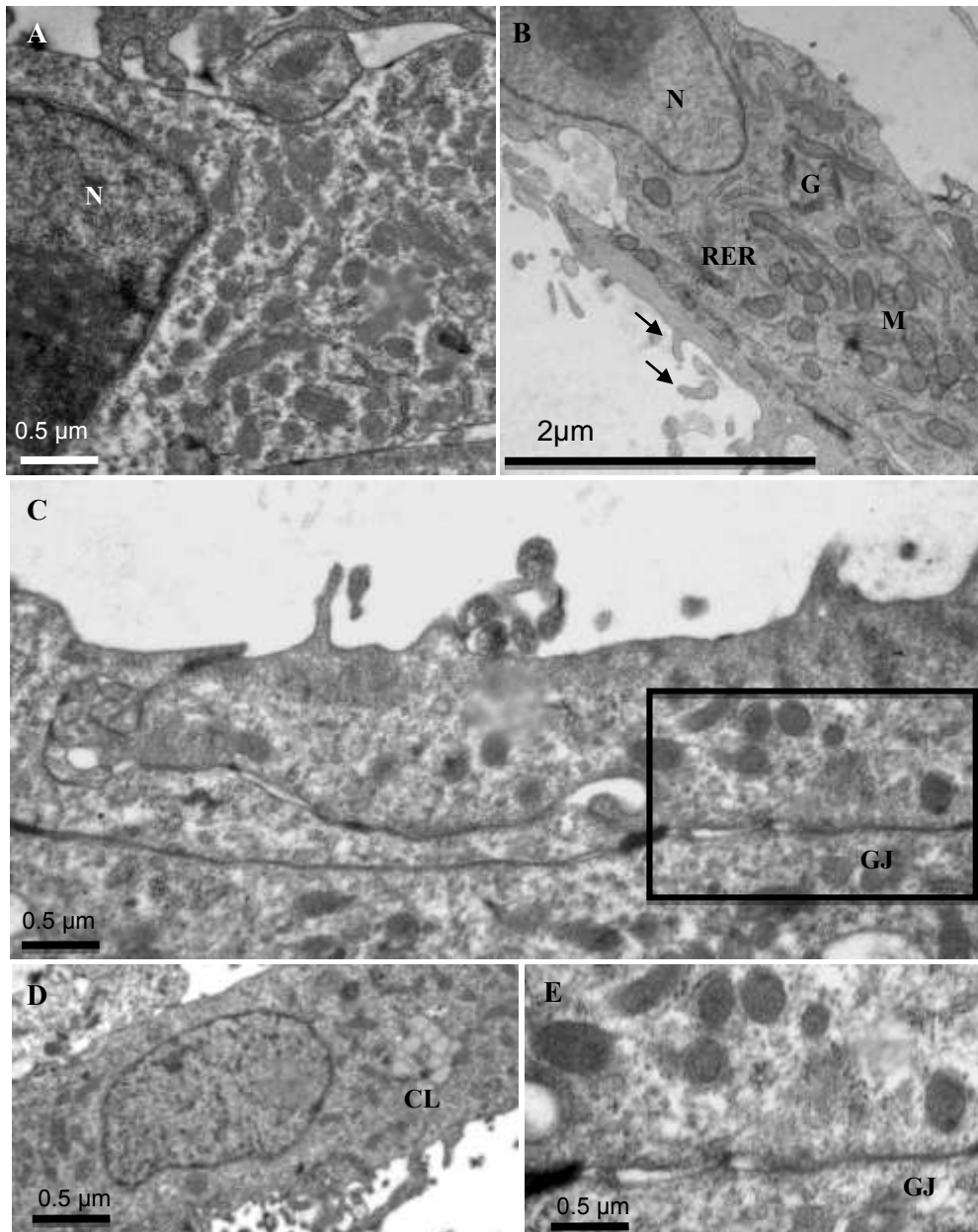


Figura 5.2 – Ultraestrutura de cultura primária de astrócitos com 96 h de cultivo (A-E). Células de grande volume, com forma irregular, prolongamentos numerosos e curtos (setas) e muitas mitocôndrias (M) (A e B). Núcleos com baixa eletrondensidade, volumosos e com interdigitações também podem ser observados (A e B). Retículo endoplasmático rugoso (RER) formado por cisternas isoladas e curtas, Golgi (G) constituído de poucas cisternas (A e B). Presença de “gap junctions” (GJ) interconectando astrócitos adjacentes (C e insert; E) e de corpúsculos lipídicos (CL) no citoplasma (D).

Regiões especializadas de membrana são observadas sob a forma de “gap junctions” interconectando astrócitos adjacentes (Fig. 5.2 C, insert e E). A figura 5.2 D mostra a presença de CL no citoplasma de astrócitos formando um conglomerado e algumas vezes como organelas isoladas distribuídas pelo citoplasma.

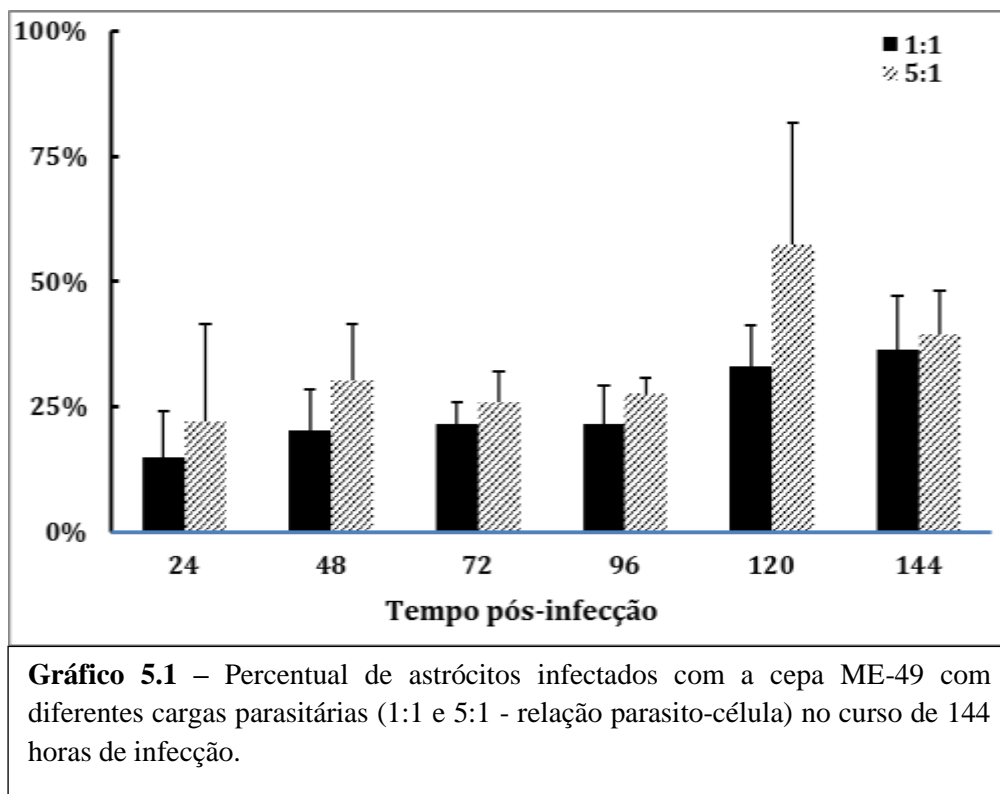
Adicionalmente, o emprego da marcação por fluorescência de GFAP permitiu estabelecer o grau de pureza dessas culturas indicando um percentual médio de astrócitos da ordem de 80,5 % no período de 18 dias de cultivo (Fig. 5.1 G-H)

5.2 CINÉTICA DA INFECÇÃO E O ESTABELECIMENTO DA CISTOGÊNESE EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE ASTRÓCITOS MURINOS DA LINHAGEM SWISS WEBSTER FRENTE A CEPAS POLARES DE *T. GONDII*

Nesses experimentos, a interação parasito-astrócitos foi mantida por 2 h, seguida da lavagem com Ringer e o meio trocado a cada 2 dias. Desta forma, foram quantificados o número de vacúolos por célula infectada e o número de parasitos dentro dos vacúolos, demonstrando a dinâmica do desenvolvimento intracelular de taquizoítos de *T. gondii* das cepas ME-49 e RH em astrócitos no período de 24 a 144 h de interação, nas relações de 1:1 e 5:1 (ME-49) e 1:1 e 3:1 (RH) parasito-astrócitos.

Com a cepa ME-49, na relação 1:1, cerca de 15% das células já estavam infectadas nas primeiras 24 h de interação, atingindo 36% em 144 h. Ensaios cuja relação foi de 5:1, ocorreu infecção em 22% das células durante as 24 h iniciais de interação, alcançando 40% em 144 h. O ápice da infecção ocorreu às 120 h de interação na relação 5:1, com um alcance de quase 60% de células infectadas (Gráfico 5.1). Nos experimentos com a cepa ME-49, nota-se que em todos os tempos, há um maior percentual de células abrigando entre 1-2 vacúolos e baixo percentual de células contendo entre 3-6, com um máximo de 18,34% em 24 h na relação 1:1 e 14,59% na relação 5:1. O percentual de células contendo 7 ou mais vacúolos teve um máximo de 19,79% em 120 h, na relação 1:1 e de 19,62% em 144 h, na relação 5:1 (Gráficos 5.2 e 5.3). Pode-se observar ainda uma alta atividade multiplicativa de parasitos (Fig. 5.3 A-H; 5.4 A-L). Em relação aos vacúolos contendo número variado de parasitos, com a cepa ME-49 foi encontrado um alto percentual de vacúolos contendo entre 1-3 parasitos em ambas as relações. O percentual de vacúolos contendo entre 4-8 parasitos foi baixo na relação 1:1,

alcançando apenas 13,16% em 96 h, enquanto na relação 5:1, obteve-se 21,45% em 48 h (Gráficos 5.4 e 5.5). A quantidade de estruturas semelhantes a cistos também foi avaliada, sendo que no primeiro experimento foram encontradas 3 estruturas no tempo de 120 h na relação 1:1 e de 6 na relação 5:1. No tempo de 144 h foram identificadas 7 estruturas na relação 1:1 e 9 na 5:1 (Gráfico 5.6). No segundo experimento, estruturas semelhantes a cistos foram observadas a partir de 72 h, sendo que neste tempo encontramos 1 na relação 1:1 e 2 na 5:1. No tempo de 96 h houve um aumento, onde 17 estruturas foram contabilizadas em ambas as relações. Em 120 h, 9 estruturas foram vistas na relação 1:1 e 15 na 5:1. Em 144 h observamos 4 estruturas na relação 1:1 e 21 na 5:1 (Gráfico 5.6). Na figura 5.5, numa mesma célula está ocorrendo a cistogênese e simultaneamente vacúolos com inúmeros parasitos, constituindo o ciclo lítico em ambas as relações parasito-célula hospedeira (Fig. 5.5 A-J).



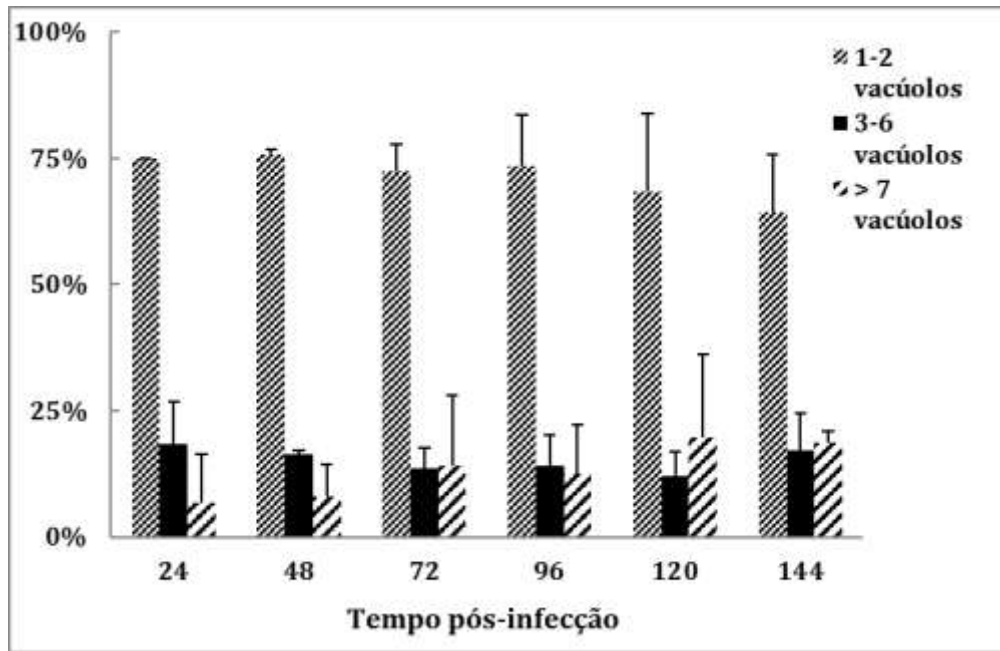


Gráfico 5.2 - Percentual de células contendo número variado de vacúolos na relação parasito-célula 1:1 no curso de 144 h de infecção com a cepa ME-49.

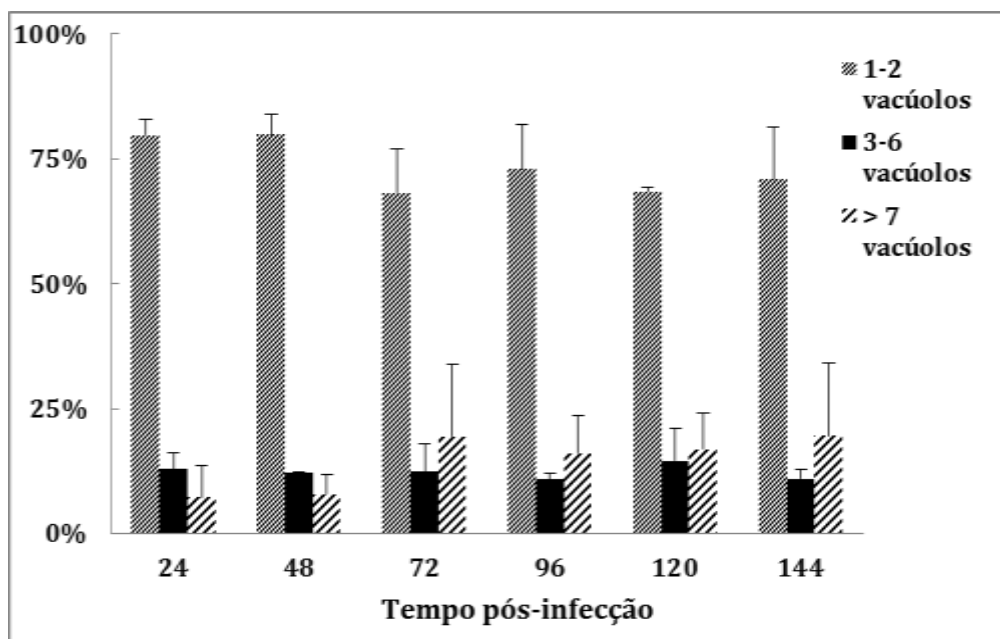


Gráfico 5.3 - Percentual de células contendo número variado de vacúolos na relação parasito-célula 5:1 no curso de 144 h de infecção com a cepa ME-49.

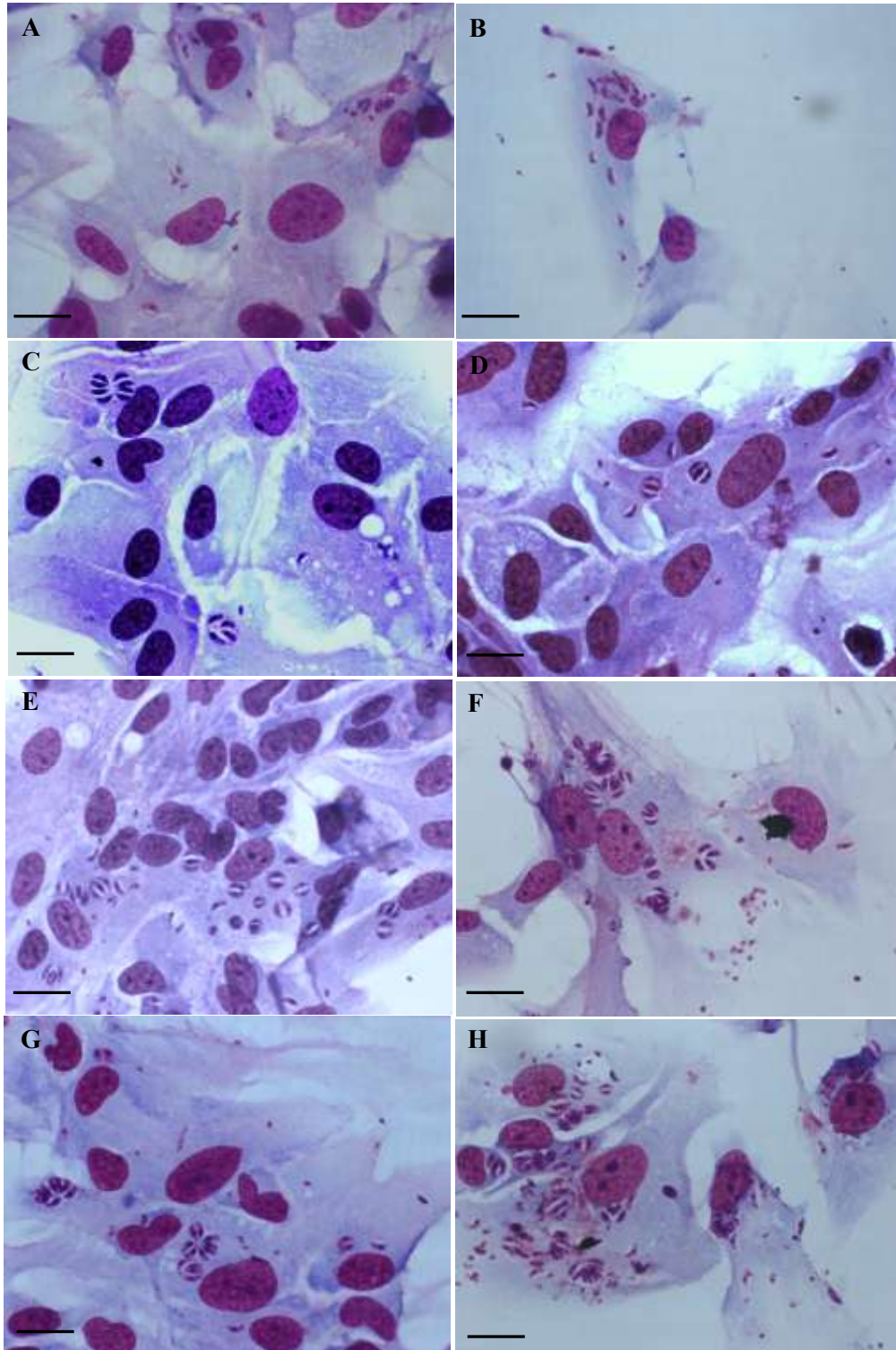


Figura 5.3 – Astrócitos infectados com taquizoítos da cepa ME-49 de *T. gondii*. No tempo de 24 h, relação parasito-célula 1:1 (A e C) e 5:1 (B e D) predominam células contendo vacúolos com um único parasito e no tempo de 48 h, relação parasito-célula 1:1 (E e F) e 5:1 (G e H) foi evidente a atividade multiplicativa dos parasitos. Barras: 10 μ m

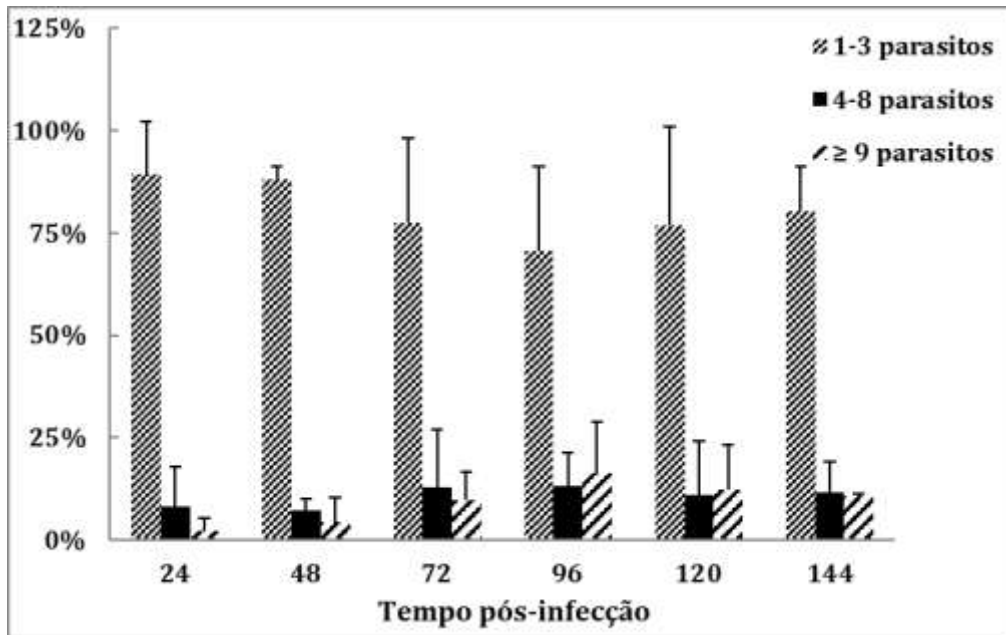


Gráfico 5.4 – Percentual de vacúolos contendo número variado de parasitos na relação parasito-célula 1:1 no curso de 144 h de infecção com a cepa ME-49.

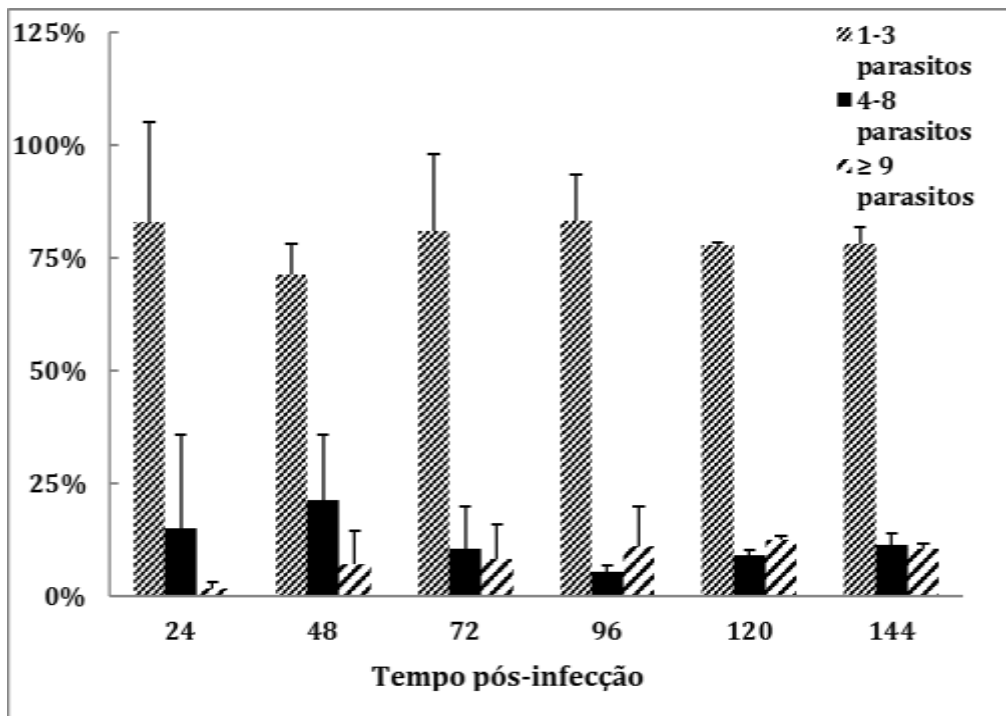


Gráfico 5.5 - Percentual de vacúolos contendo número variado de parasitos na relação parasito-célula 5:1 no curso de 144 h de infecção com a cepa ME-49.

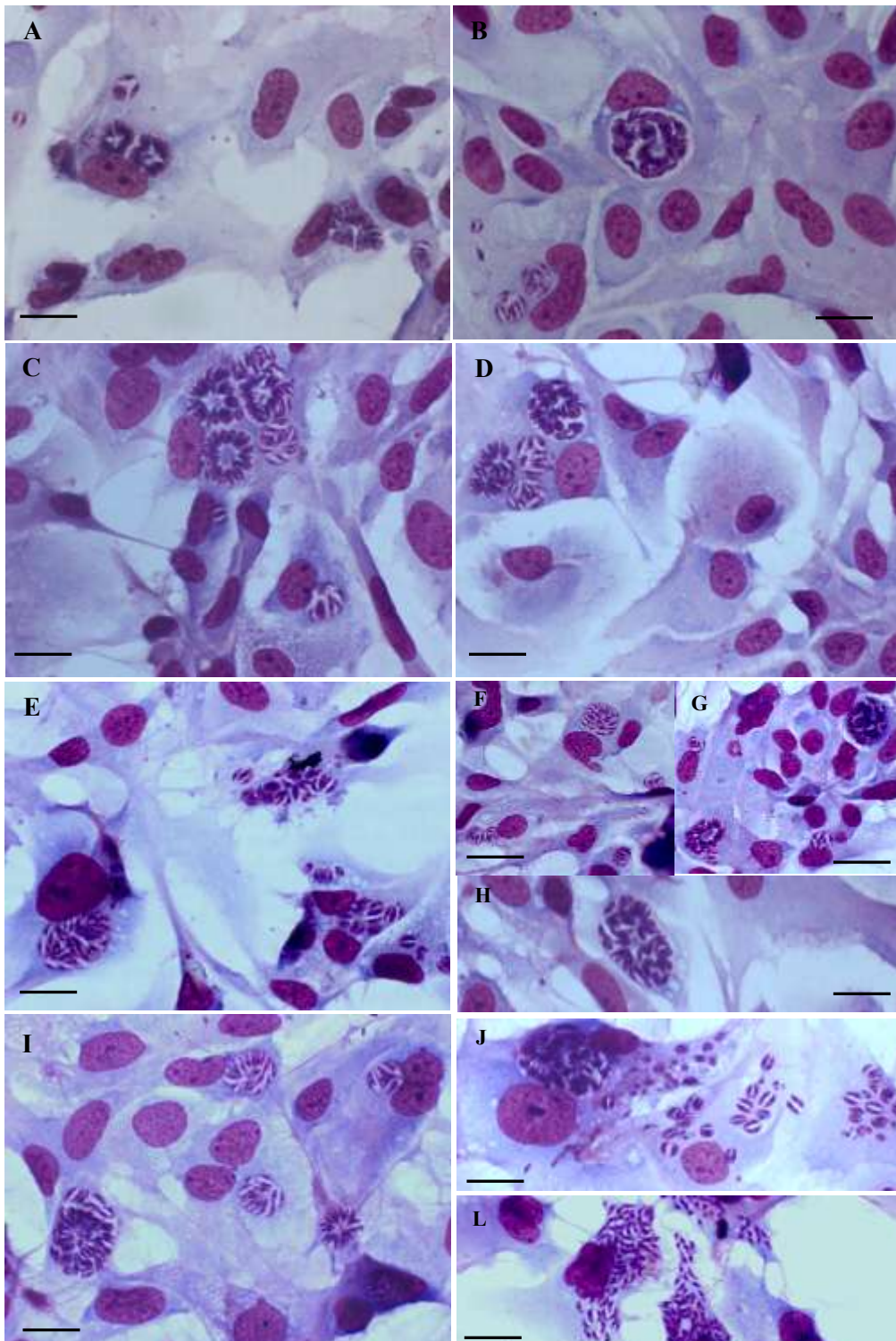


Figura 5.4 – Astrócitos infectados com taquizoítos da cepa ME-49 de *T. gondii* no tempo de 72 h, relação parasito-célula 1:1 (A e C) e 5:1 (B e D), e no tempo de 96 h, relação parasito-célula 1:1 (E, F, G e H) e 5:1 (I, J e L). Barras: 10 μ m.

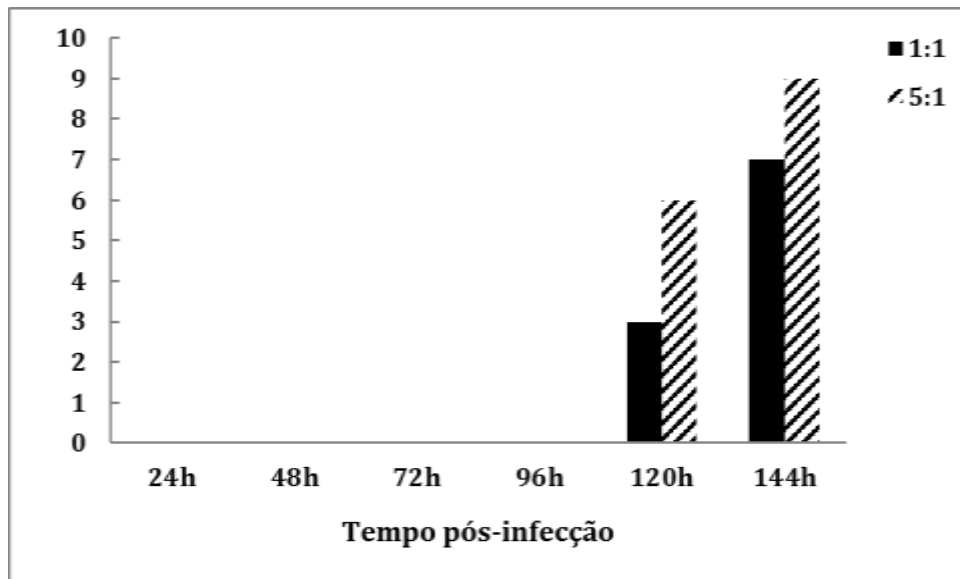


Gráfico 5.6 - Número de estruturas semelhantes a cistos encontradas em astrócitos infectados com taquizoítos da cepa ME-49 nas relações 1:1 e 5:1. Experimento 1

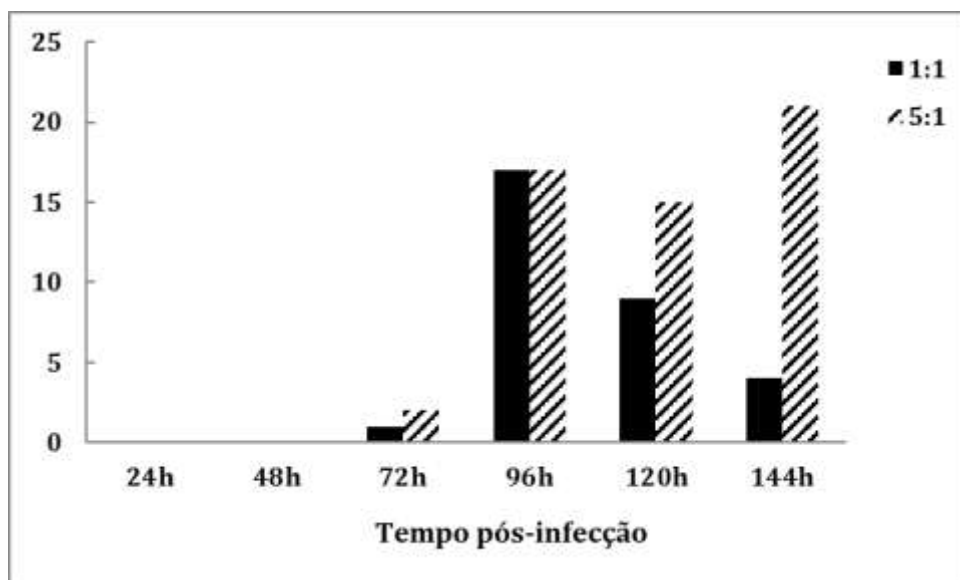


Gráfico 5.7 - Número de estruturas semelhantes a cistos encontradas em astrócitos infectados com taquizoítos da cepa ME-49 nas relações 1:1 e 5:1. Experimento 2

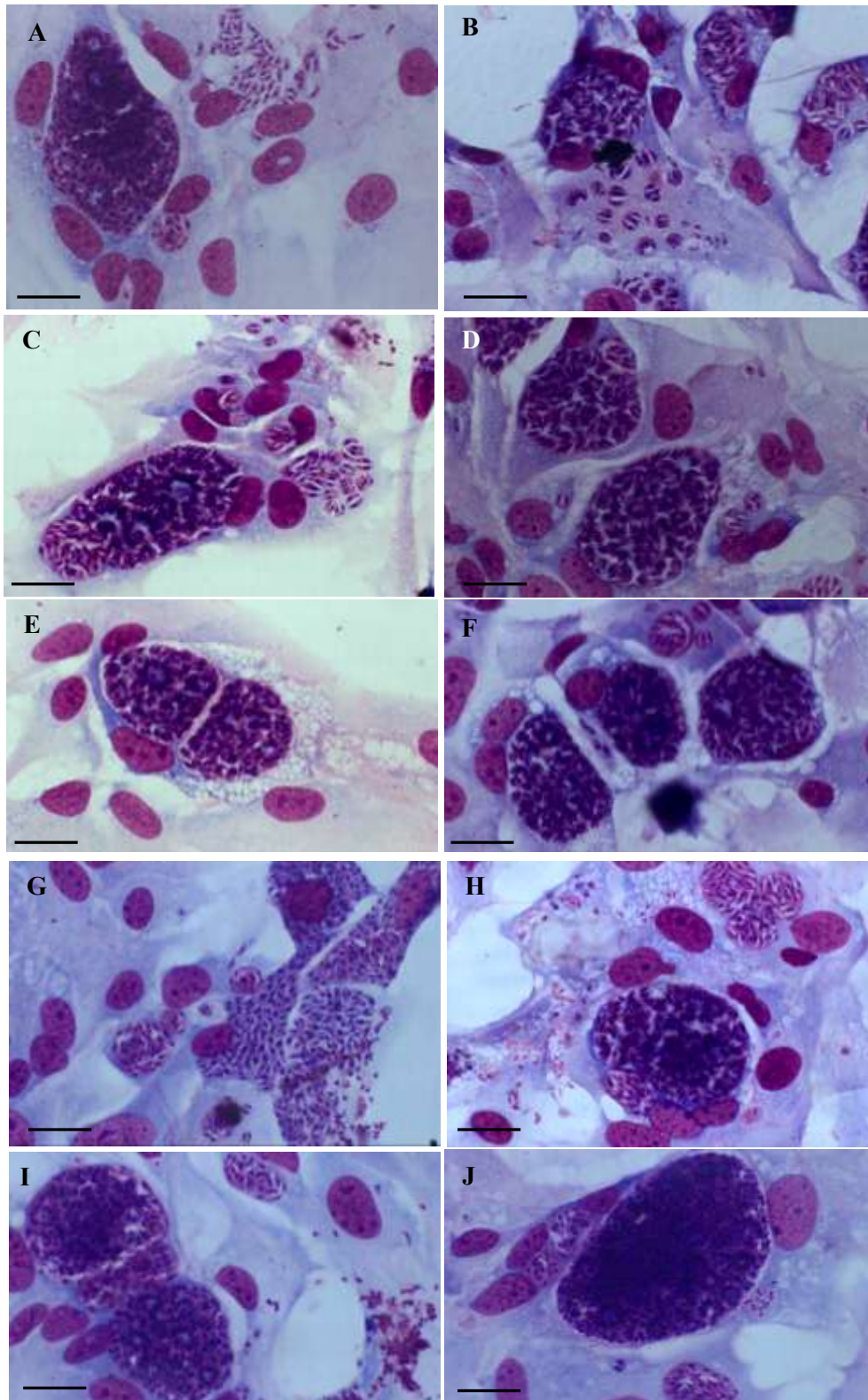


Figura 5.5 – Astrócitos infectados com taquizoítos da cepa ME-49 de *T. gondii* no tempo de 120 h, relação parasito-célula 1:1 (A, C, E, G e I) e 5:1 (B, D, F, H e J). Diferentes estágios de desenvolvimento intracelular e formação de estruturas similares a cistos. Imagens representativas do experimento 1. Barras: 10 μ m

A fim de confirmar o estabelecimento da cistogênese em astrócitos infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii*, foi aplicada a técnica de citoquímica com o auxílio da lectina DBA, revelando a presença de cistos já a partir de 72 h de infecção, considerando-se neste caso somente a relação 5:1 parasito-astrócito (Fig. 5.6 A-E). Essas imagens mostram cistos mistos contendo formas taquizoítas e bradizoítas, células com vacúolos repletos de taquizoítas e com cistos sem marcação no seu interior, indicativo de presença de somente bradizoítas.

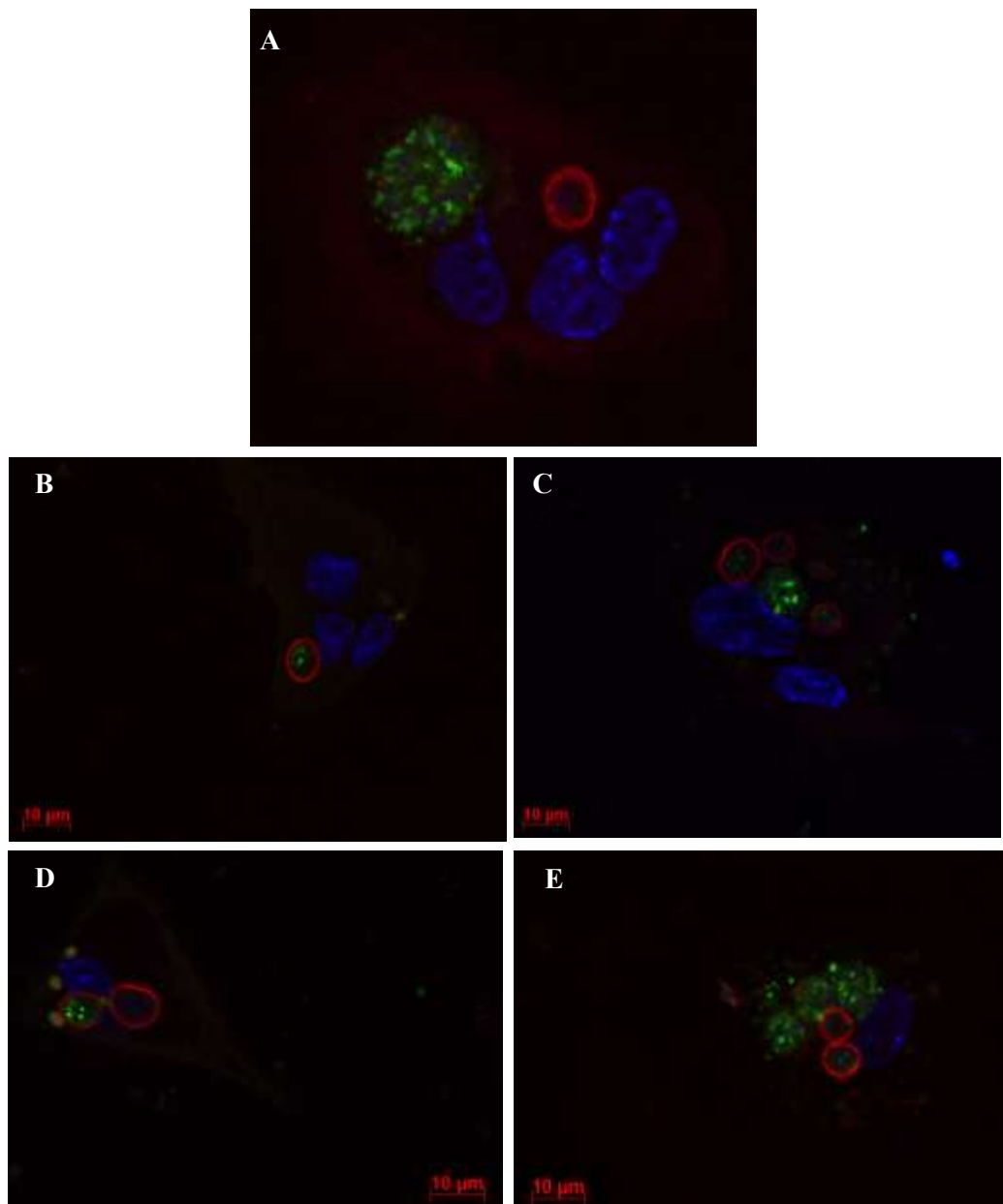


Figura 5.6 - Estabelecimento da cistogênese em astrócitos infectados com taquizoítas da cepa ME-49 de *T. gondii* no tempo de 72 h, relação parasito-célula 5:1 (A-E). Parede cística revelada com a lectina DBA em vermelho. Taquizoítas marcados com anticorpo anti-P30 (verde) e núcleos revelados em azul com o intercalante de DNA, DAPI.

As análises da infectividade realizadas com a cepa RH indicaram uma baixa taxa de infecção de astrócitos em 24 h, na relação 1:1, em que 10,57% das células estavam infectadas, enquanto na relação 3:1, um percentual de apenas 9,74%. Ocorreu um aumento progressivo no percentual de infecção ao longo do tempo, atingindo 32% de células infectadas às 144 h, na relação 1:1 e 38,97% na relação 3:1 (Gráfico 5.8). Na avaliação de células contendo número variado de vacúolos, na relação 1:1 observamos que com 24 h, 93% das células albergavam entre 1-2 vacúolos, com um decréscimo entre 48 e 120 h, seguido por um aumento em 144 h. O percentual de células contendo 3-6 ou 7 ou mais vacúolos aumentou ao longo do tempo, com poucas variações (Gráfico 5.9). Na relação 3:1 as condições se mantiveram muito semelhantes às da relação 1:1 (Gráfico 5.10).

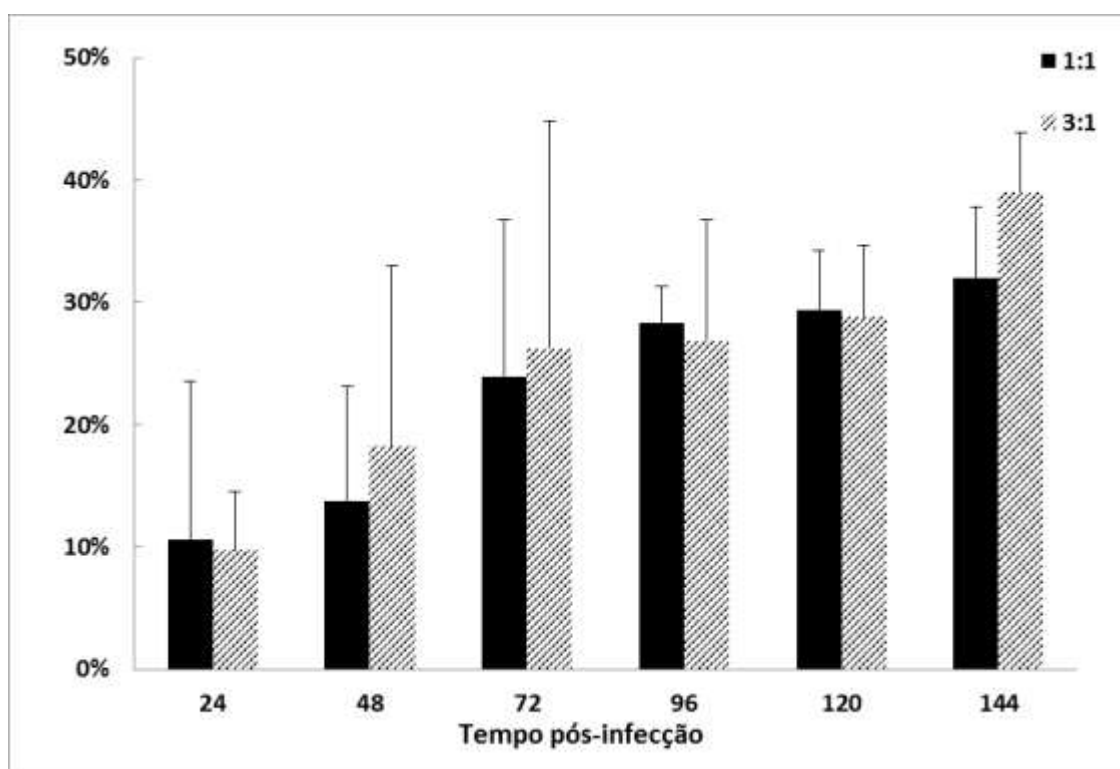


Gráfico 5.8 – Percentual de astrócitos infectados com a cepa RH com diferentes cargas parasitárias (1:1 e 3:1 - relação parasito-célula) no curso de 144 h de infecção.

Na avaliação de vacúolos contendo número variado de parasitos, observamos com 24 h na relação 1:1, quase 74% dos vacúolos continham entre 1-3 parasitos, chegando a 88,69% em 144 h. O percentual de vacúolos contendo entre 4-8 parasitos foi expressivo com 24 h, totalizando 25,22%, seguido por uma queda nos demais tempos, enquanto vacúolos contendo 9 ou mais parasitos tiveram um baixo percentual em todos os tempos, sendo o mais alto em 48 h, com 9,26% (Gráfico 5.11). A relação 3:1 mostrou aspectos muito semelhantes (Gráfico 5.12). Em relação às estruturas semelhantes a cistos, no primeiro experimento com a cepa RH encontramos 2 em 72 h, relação 3:1; em 96 h foram encontradas 2 na relação 1:1 e 7 na relação 3:1; em 120 h, 4 na relação 1:1 e 7 na 3:1. Por final, com 144 h foram encontradas 4 estruturas na relação 3:1 (Gráfico 5.13). No segundo experimento foram encontradas apenas 2 no tempo de 72 h e 3 em 144 h, ambas na relação 3:1 (Gráfico 5.14). Imagens da infecção com a cepa RH podem ser observadas na figura 5.7 (A-H), assim como estruturas semelhantes a cistos (Fig. 5.7 G e H).

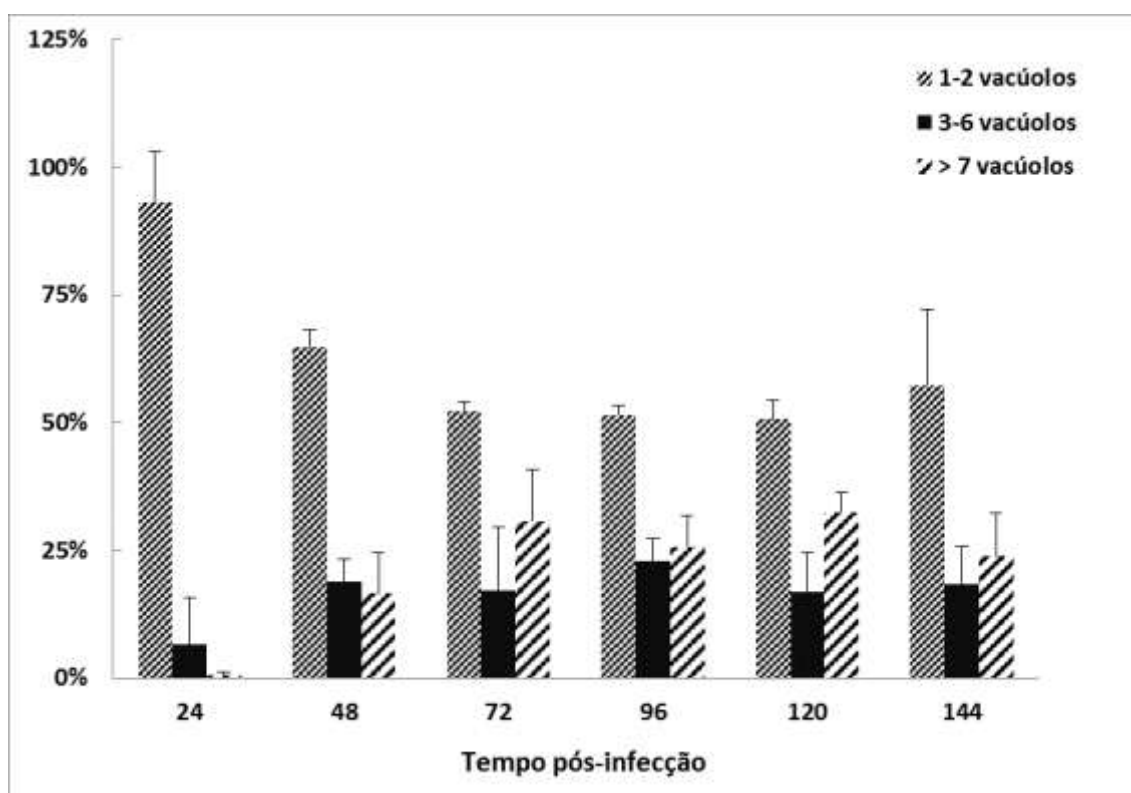


Gráfico 5.9 - Percentual de células contendo número variado de vacúolos na relação parasito-célula 1:1 no curso de 144 h de infecção com a cepa RH.

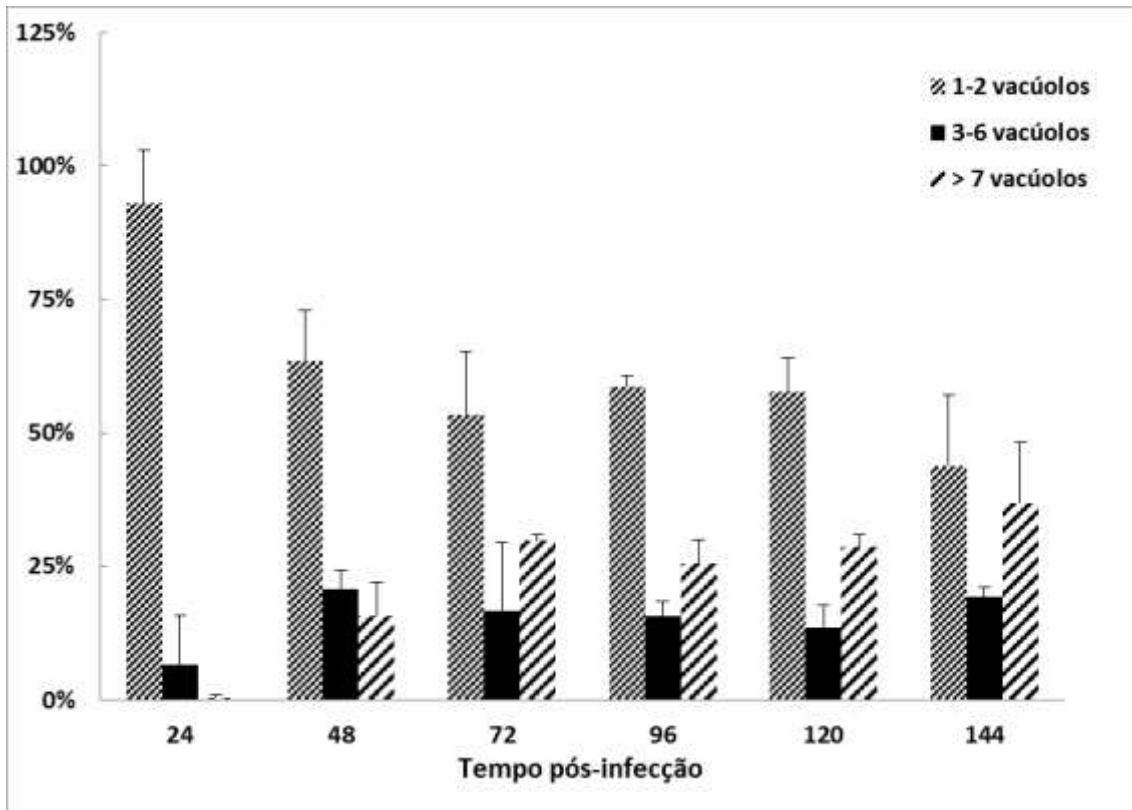


Gráfico 5.10 - Percentual de células contendo número variado de vacúolos na relação parasito-célula 3:1 no curso de 144 h de infecção com a cepa RH.

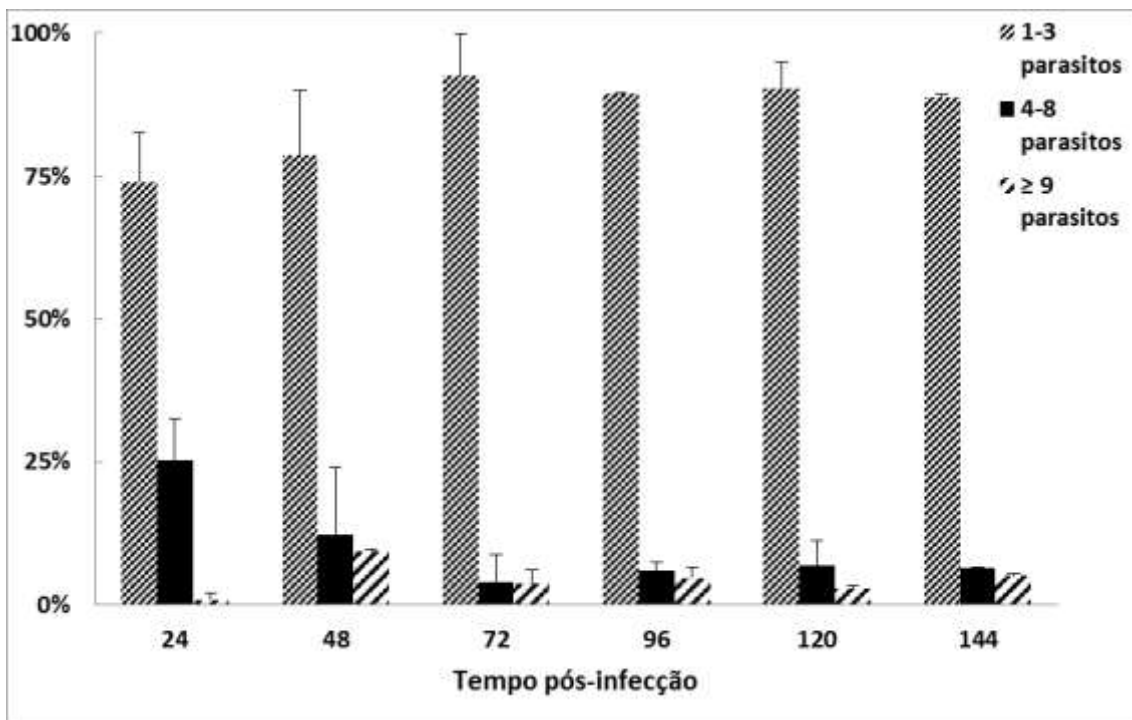


Gráfico 5.11 - Percentual de vacúolos contendo número variado de parasitos na relação parasito-célula 1:1 no curso de 144 h de infecção com a cepa RH.

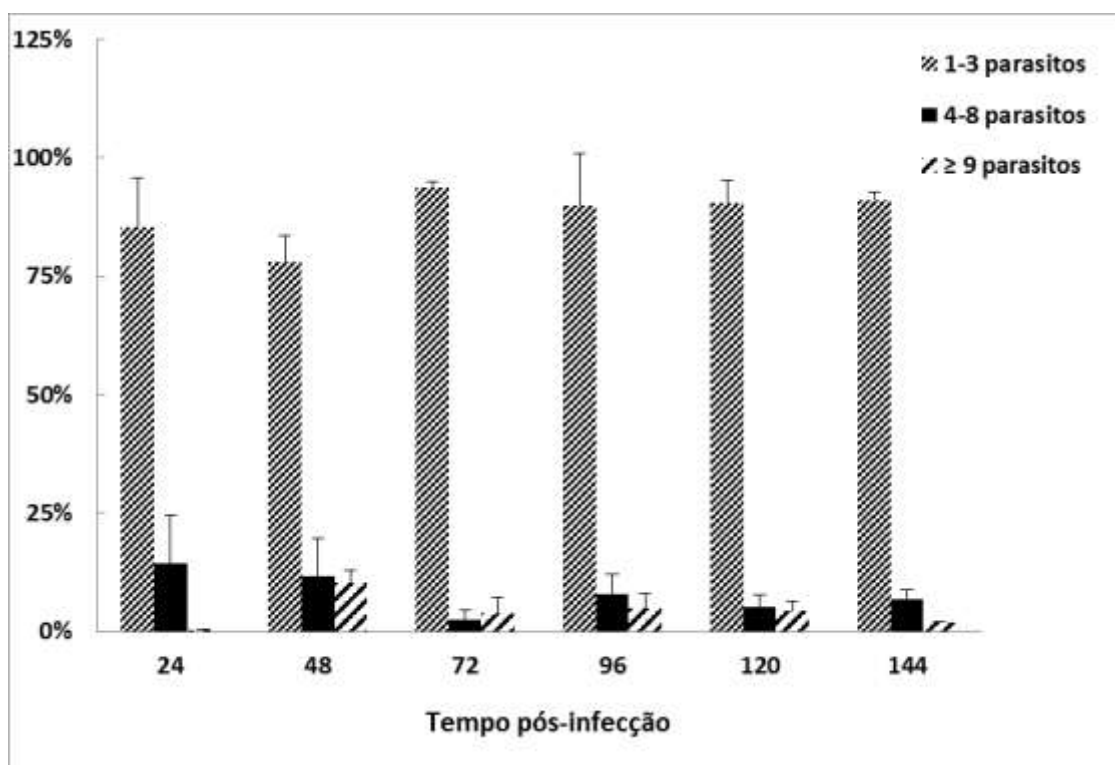


Gráfico 5.12 - Percentual de vacúolos contendo número variado de parasitos na relação parasito-célula 3:1 no curso de 144 h de infecção com a cepa RH.

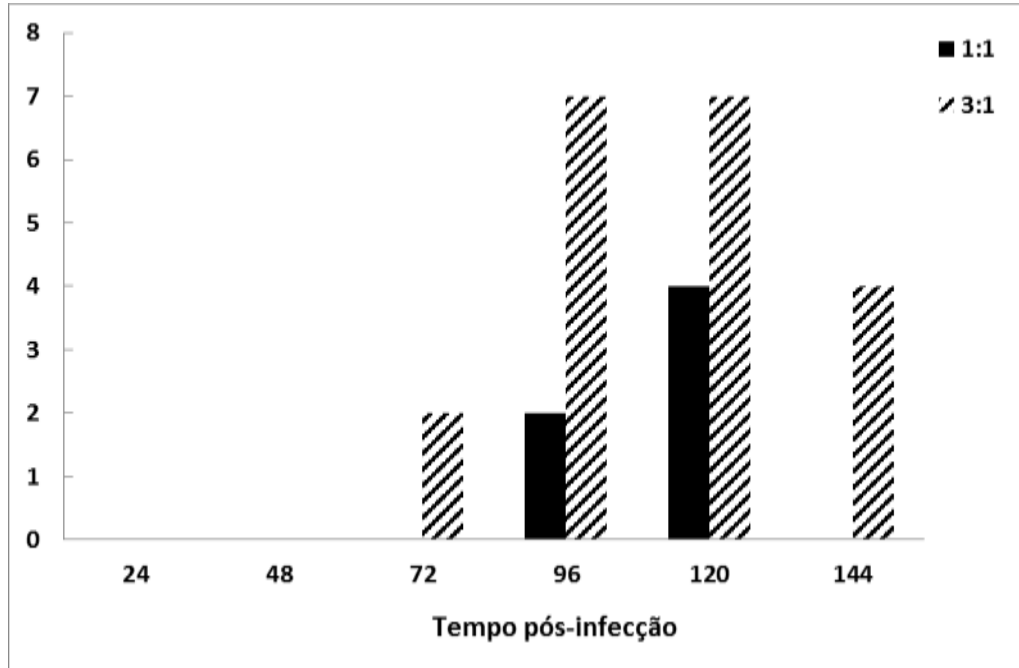


Gráfico 5.13 - Número de estruturas semelhantes a cistos encontradas em astrócitos infectados com taquizoítos da cepa RH nas relações 1:1 e 3:1. Experimento 1

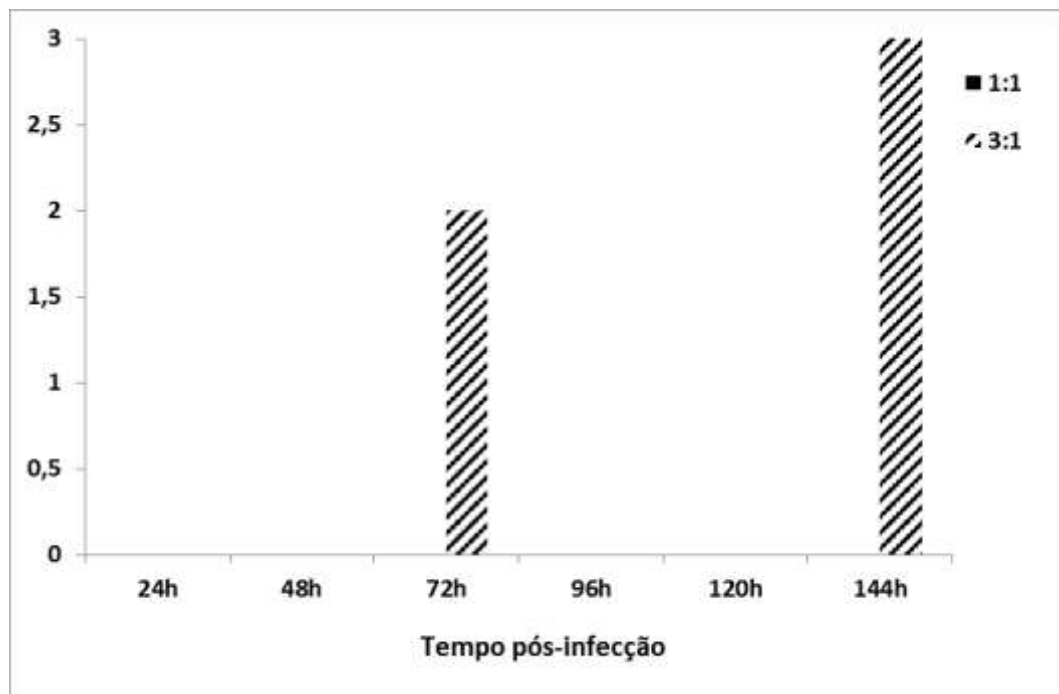


Gráfico 5.14 - Número de estruturas semelhantes a cistos encontradas em astrócitos infectados com taquizoítos da cepa RH nas relações 1:1 e 3:1. Experimento 2

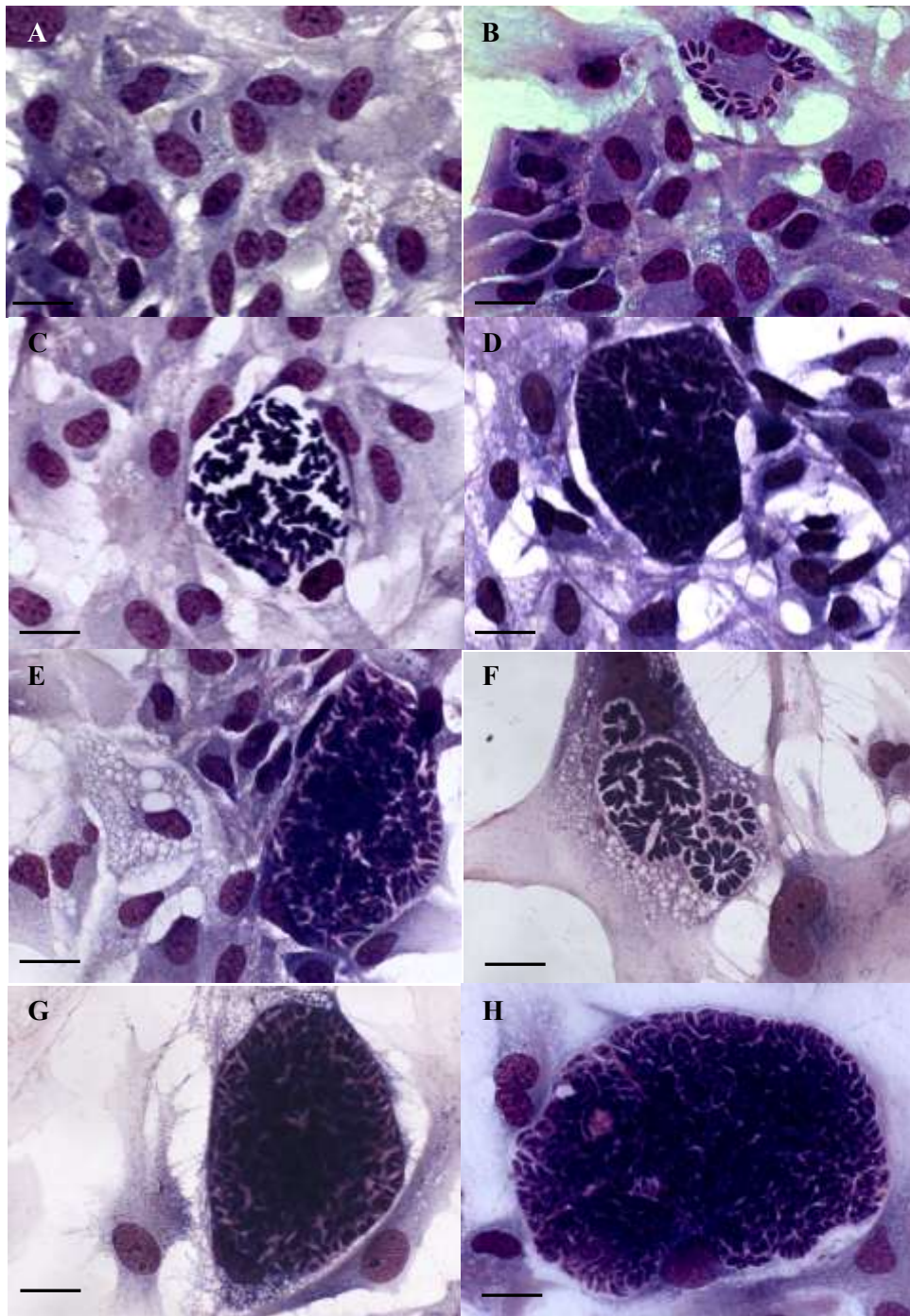


Figura 5.7 – Astrócitos infectados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* na relação parasito-célula 1:1: (A) 24 h, (B) 48 h, (C) 72 h, (D) 96 h, (E) 120 h, (F) 144 h. Relação 3:1: (G) 120 h, (H) 144 h. Barras: 10 μm

5.3. ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DA INTERAÇÃO DE *T. GONDII* E ASTRÓCITOS

Culturas primárias de astrócitos infectadas com taquizoítos da cepa ME-49 de *T. gondii* (proporção 5 parasitos por célula hospedeira) foram analisadas por MET após períodos que variaram entre 48 até 196 h de interação. O processo de interação do *T. gondii* com células hospedeiras envolve dois eventos distintos: adesão e invasão, que juntos podem ser deflagrados em menos de 30 segundos. A invasão consiste na localização do parasito num compartimento envolto por membrana no citoplasma da célula hospedeira, o vacúolo parasitóforo (VP). A falta de sincronismo destes processos limita uma avaliação temporal e por isso optamos por analisar esses eventos definindo alguns parâmetros que possam nos auxiliar a entender, não temporalmente, mas sim a dinâmica desse evento com base na identificação dos estágios infectivos, nas diferentes etapas do ciclo celular do parasito e as alterações morfológicas do VP decorrentes do desenvolvimento do ciclo lítico e do encistamento do parasito em astrócitos.

A análise de mais de três centenas de imagens de cortes ultrafinos de culturas infectadas mostrou alguns aspectos da resposta celular à presença do parasito. Em decorrência da liberação de taquizoítos que concluíram o ciclo lítico já após 48 h de interação foi possível registrar a adesão do parasito à membrana da célula hospedeira e mostrar a sua participação ativa neste processo, com a extrusão do conóide e o grande acúmulo de micronemas na região anterior do corpo do parasito, os quais atuam decisivamente no processo de reconhecimento celular, por meio de proteínas adesinas secretadas (Fig. 5.8 A). O monitoramento da resposta celular à presença do parasito intracelular foi feito estabelecendo-se alguns critérios que foram: a presença de VP contendo um único parasito, distinguindo-se a forma infectiva - taquizoíto (proveniente de uma infecção recente/reinfecção), forma em transição entre taquizoíto e bradizoíto ou bradizoíto; vacúolos contendo dois ou mais parasitos (produto da divisão celular); vacúolos mistos contendo ambos os estágios infectivos/evolutivos e, ainda, células com vacúolos múltiplos apresentando número variável de parasitos no seu interior, após 48 ou 72 h de infecção.

A análise de astrócitos infectados com um único parasito durante as 48 h de interação mostrou formas em transição para bradizoítos apresentando alguns grânulos de amilopectina (Fig. 5.8 B). Mitocôndrias e perfis de retículo endoplasmático rugoso (RER) foram observados junto à MVP que se apresenta bastante rugosa compatível com as modificações

que ocorrem durante a formação da parede cística (Fig. 5.8 B). Figuras 5.8 C e D mostram em detalhes a distribuição radial de mitocôndrias circundando o VP associadas diretamente à MVP ou estabelecendo esse contato mediado pelo RER (Fig. 5.8 C e D). Nota-se que a interação de RER à MVP se dá via sua face lisa estando a face rugosa (com ribossomos) voltada para o citoplasma da célula hospedeira (Fig. 5.8 B-D). Vacúolos contendo um único parasito apertado, apresentando uma rede túbulo-vesicular (RTV) pouco desenvolvida também foram observados (Fig. 5.8 B-D). Muitas vezes, essa associação do RER à MVP não foi contínua, deixando desnudas algumas áreas da MVP e mitocôndrias foram localizadas nessas áreas desprovidas de RER interagindo diretamente com a MVP (Fig. 5.8 C e D). A análise de culturas infectadas entre 72 e 96 h mostra células com infecções múltiplas decorrentes da conclusão do ciclo lítico com liberação de parasitos e infecção de novas células e vacúolos com mais de um parasito produto da divisão celular por endodiogenia (Fig. 5.9 A-D). Durante este processo há um aumento da síntese de RTV com concomitante aumento da matriz vacuolar e a manutenção da associação de organelas da célula hospedeira à MVP (Fig. 5.9 A-D). Como resultado de infecções múltiplas com 96 -120 h de interação foi comum observar em uma mesma célula mais de um vacúolo contendo número variado de parasitos em diferentes estágios do ciclo celular (Fig. 5.10 A-C). Várias imagens sugerem um íntimo contato entre esses VP permitindo a comunicação entre eles (Fig. 5.10 A-C). Rosetas características do processo final de endodiogenia são observadas nesse período mostrando alta atividade desses parasitos em astrócitos (Fig. 5.11 A). Células repletas de parasitos podem ser vistas na figura 5.11 B, e comunicação entre vacúolos maduros e imaturos (2 parasitos) que culminará com a conclusão do ciclo lítico liberando os parasitos intracelulares. Imagem representativa do processo de egresso dos parasitos da célula hospedeira com a extrusão do conóide e alta concentração de micronemas na região apical do parasito mostra o contato íntimo dessa estrutura com a face interna da membrana do VP (Fig. 5.12).

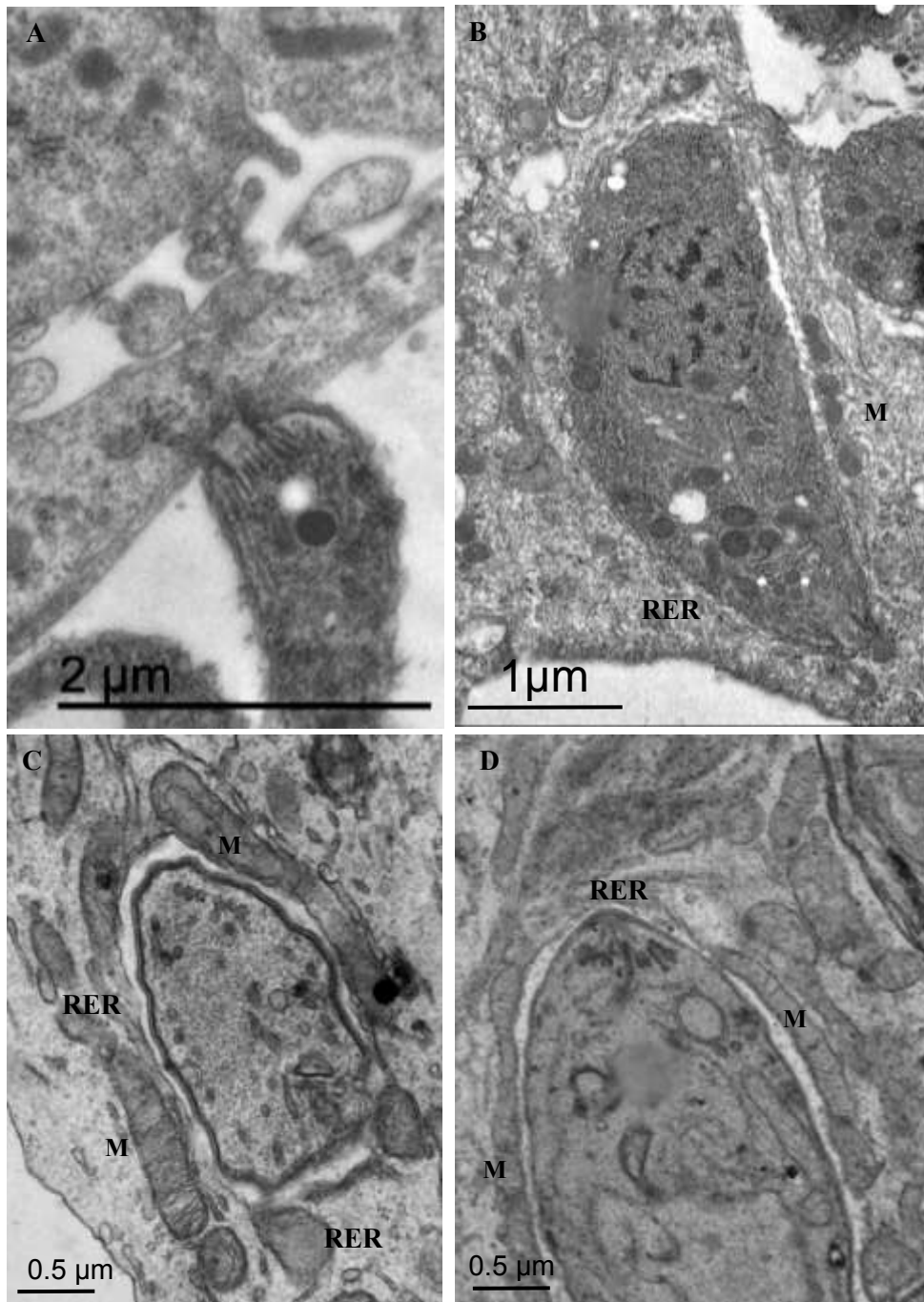


Figura 5.8 - Aspectos ultraestruturais de astrócitos após 48 h de infecção com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49. Adesão do parasito à membrana da célula hospedeira mostrando extrusão do conóide e acúmulo de micronemas na região anterior (A). Parasitos em fase de transição para bradizoítos, com a presença de grânulos de amilopectina e organelas como mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático rugoso (RER) junto à membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) (B). Mitocôndrias e retículo endoplasmático circundando a MVP (C-D).

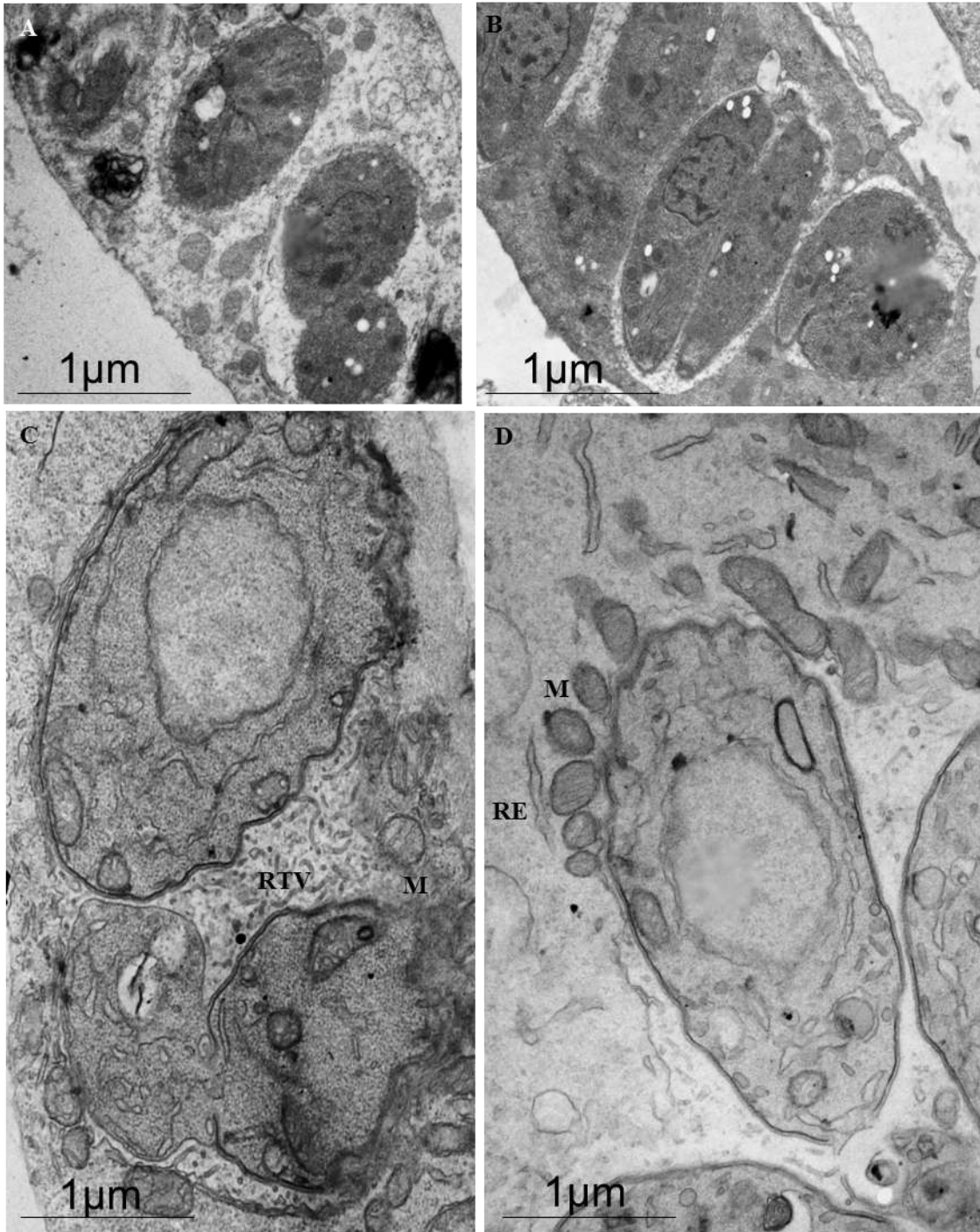


Figura 5.9 – Aspectos ultraestruturais de astrócitos entre 72 e 120 h de infecção com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49. (A e B) Distintas fases da infecção, com a presença de vacúolos contendo número variado de parasitos. (C e D) Célula com aumento da síntese da rede túbulo-vesicular (RTV) e concomitante aumento da matriz vacuolar e presença de organelas associadas.

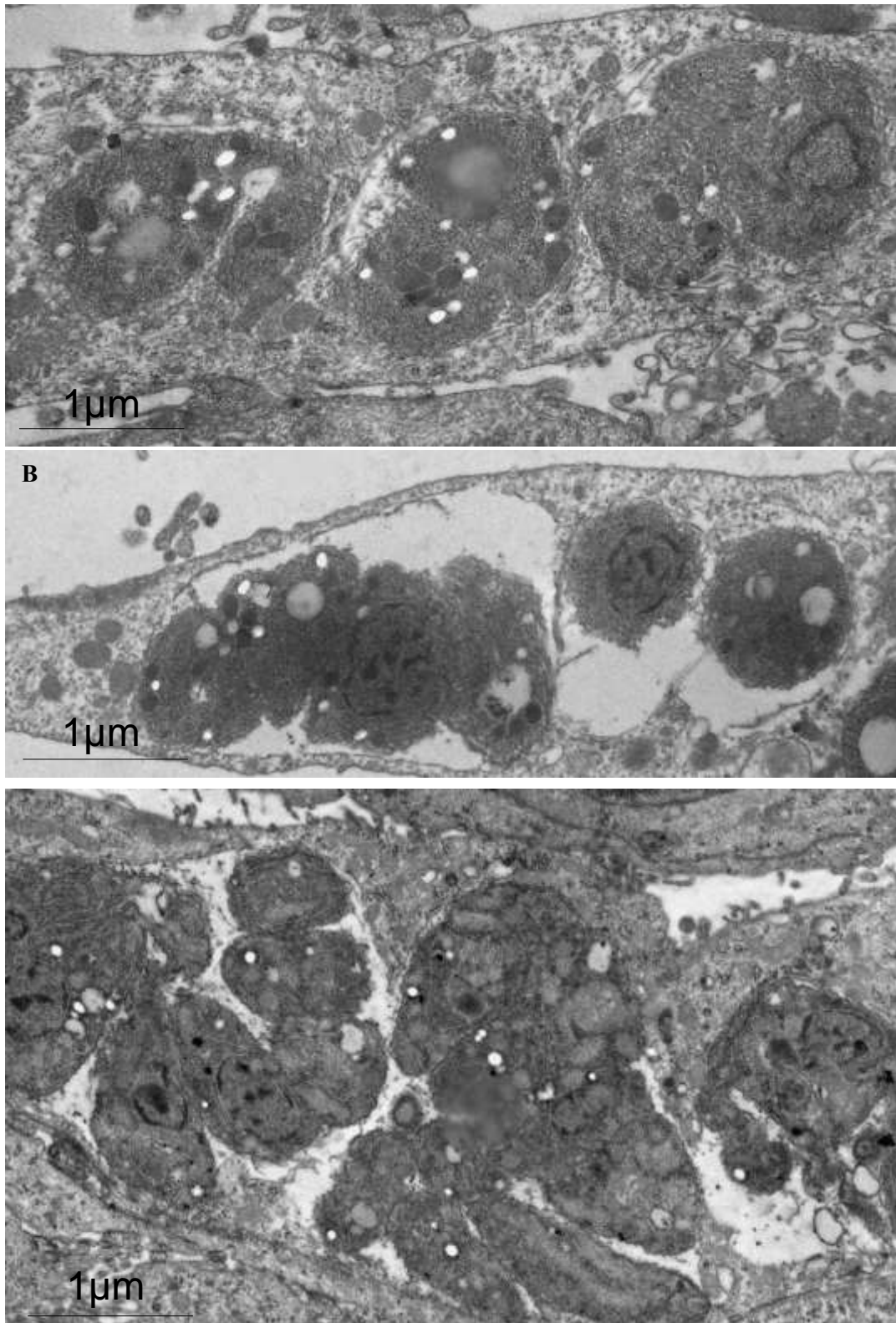


Figura 5.10 – Aspectos ultraestruturais de astrócitos após 96 h de infecção com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49. (A-C) Podem ser vistos mais de um vacúolo por célula com a presença de número variado de parasitos em diferentes estágios do ciclo celular, com comunicação entre os vacúolos parasitóforos.

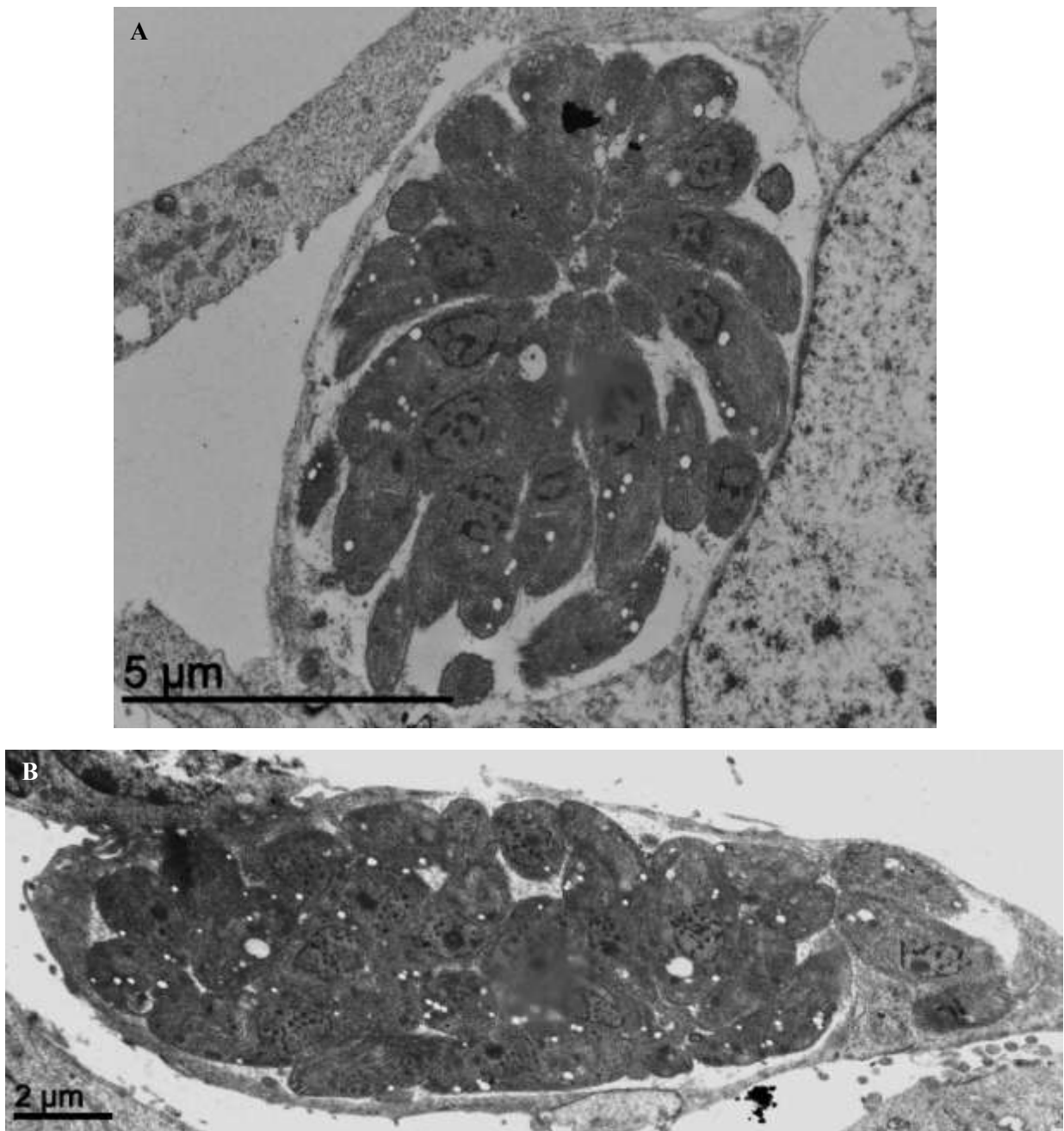


Figura 5.11 - Aspectos ultraestruturais de astrócitos após 96 – 120 h de infecção com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49. (A) Rosetas características do processo final de endodiogenia. (B) Alta quantidade de parasitos desorganizados no interior de um grande vacúolo finalizando o processo do ciclo lítico.



Figura 5.12 - Aspectos ultraestruturais de astrócitos após 96 h de infecção com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49. Parasitos em fase de egresso da célula hospedeira mostrando extrusão do conóide e acúmulo de micronemas na região apical. M: Mitocôndria; RER: retículo endoplasmático rugoso; RTV: rede túbulo-vesicular; VP: vacúolo parasitóforo.

No período de 96-144 h um dado que chamou a atenção foi a presença de algumas células contendo grande quantidade de parasitos degradados no interior de células que albergavam também parasitos viáveis (Fig. 5.13 A e B). Pode-se observar também, na mesma célula, vacúolos em plena atividade multiplicativa ao lado de vacúolos contendo taquizoítos e bradizoítos em processo avançado de morte celular (Fig. 5.14 A-C). Entretanto, vacúolos contendo parasitos degradados ainda mantinham a associação de organelas à MVP (Fig. 5.15).

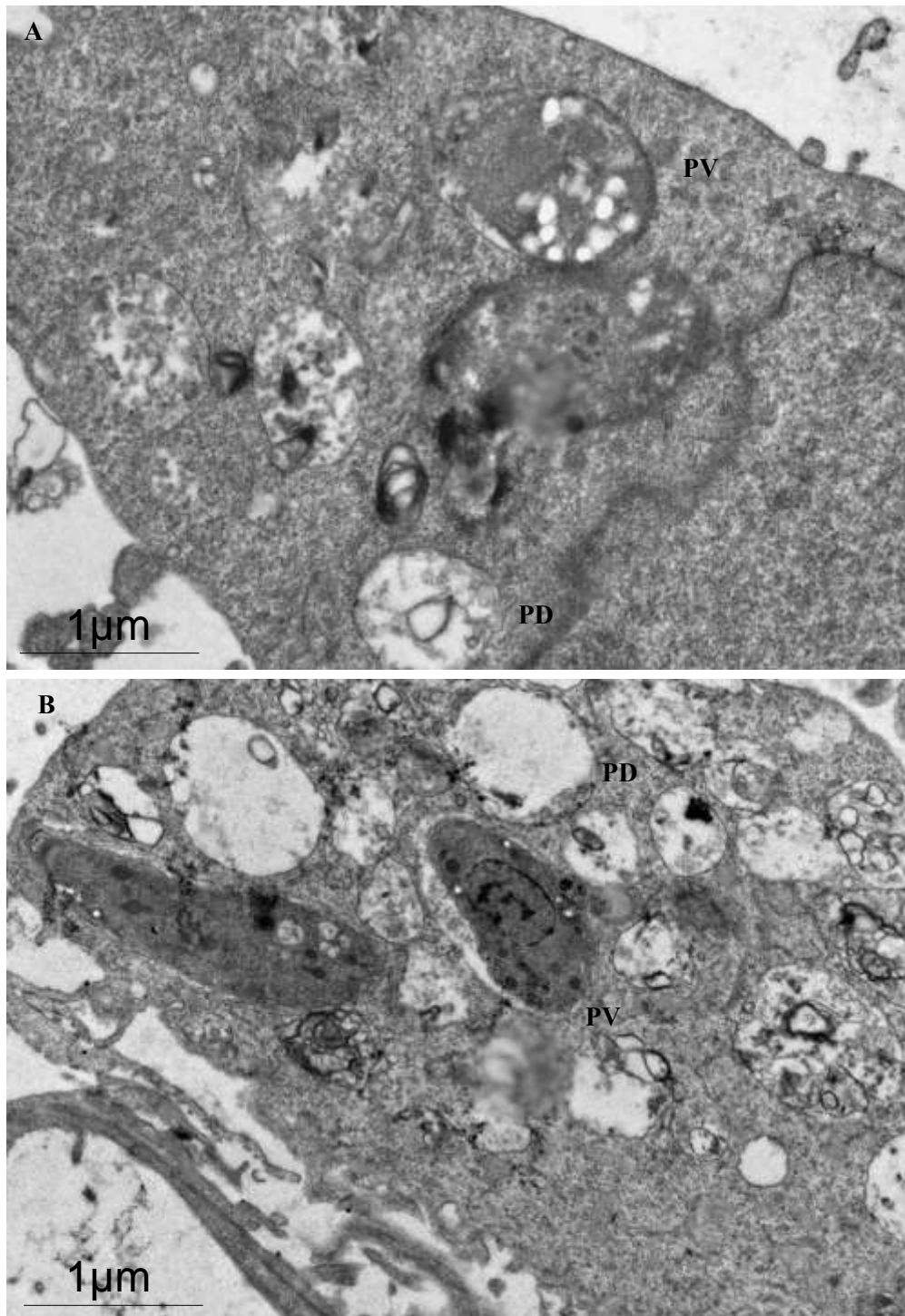


Figura 5.13 - Aspectos ultraestruturais de astrócitos após 96 e 144 h de infecção com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49. (A e B) Presença de parasitos degradados e viáveis no interior de uma mesma célula. PV: parasito viável; PD: parasito degradado.

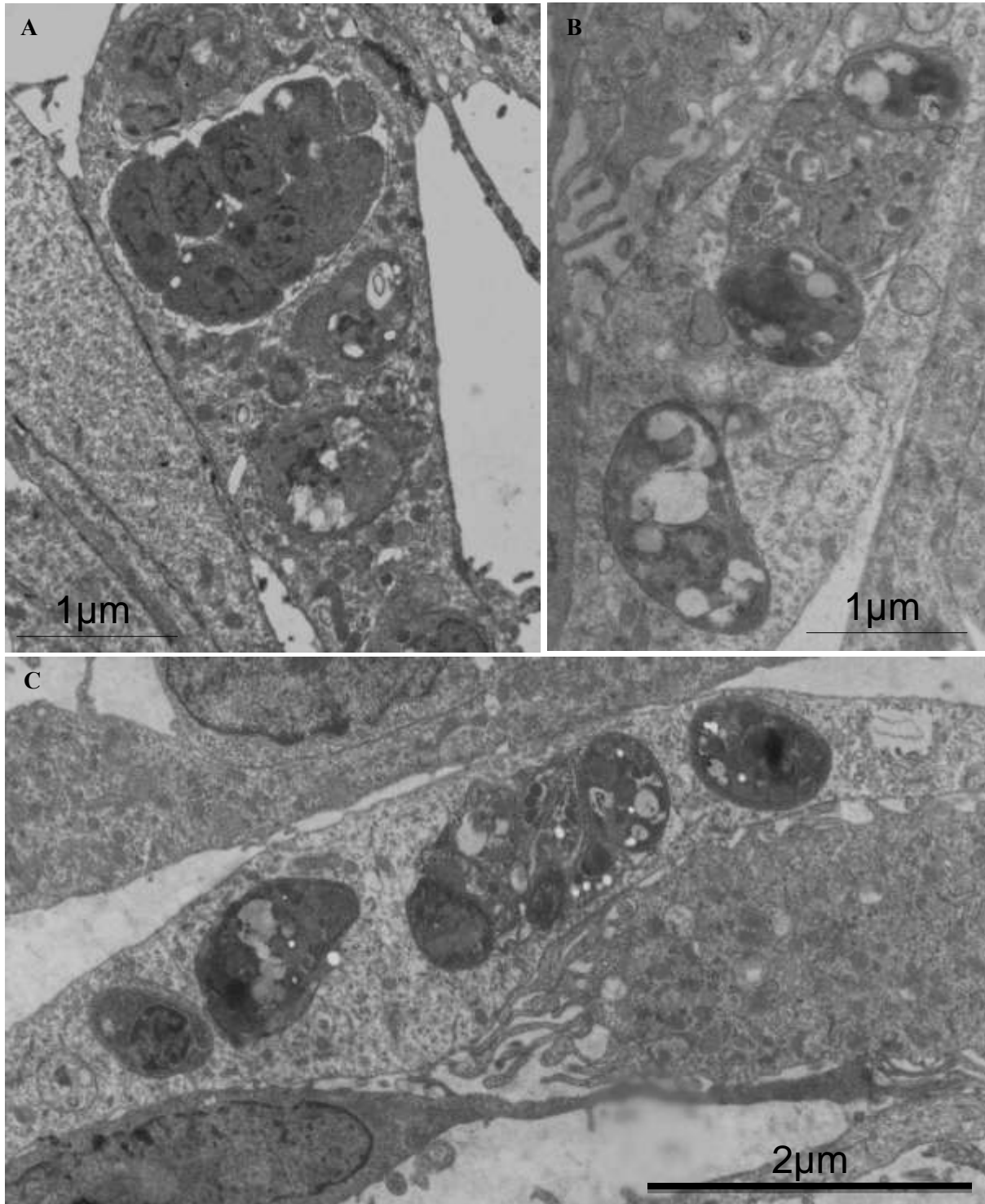


Figura 5.14 - Aspectos ultraestruturais de astrócitos após 144 h de infecção com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49. (A-C) Vacúolos em atividade multiplicativa ao lado de vacúolos contendo as formas taquizoítas e bradizoítas em processo de morte celular.

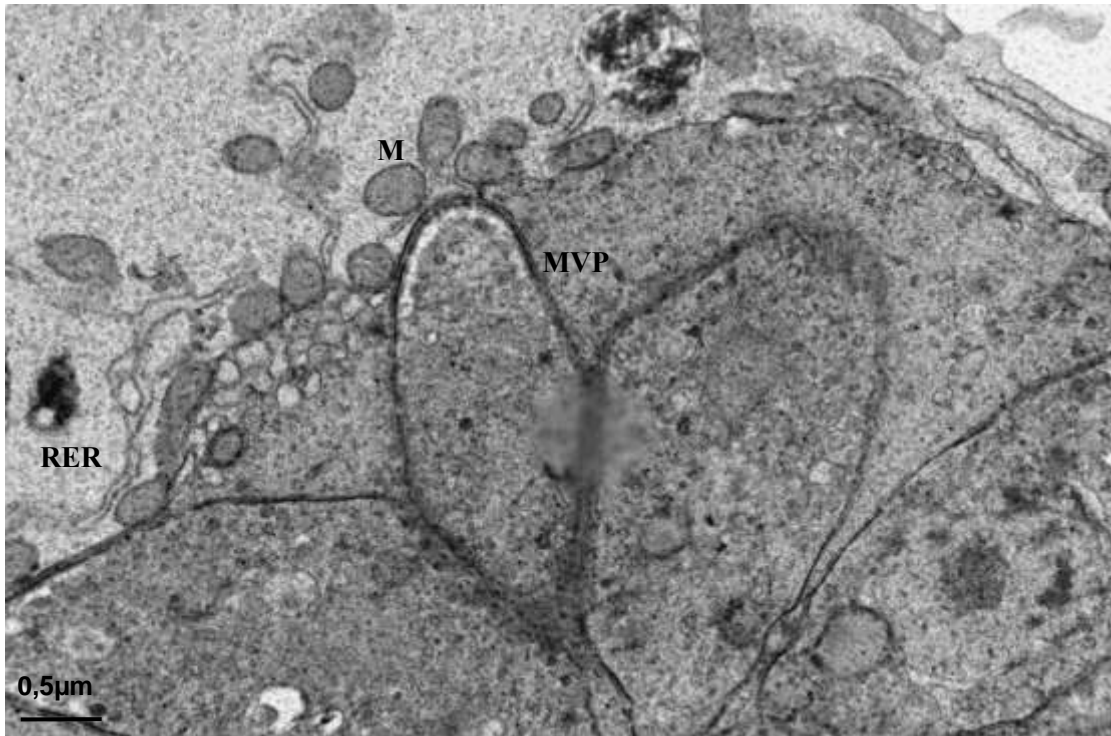


Figura 5.15 - Aspectos ultraestruturais de astrócitos após 144 h de infecção com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49. Vacúolos contendo parasitos degradados que ainda mantinham a associação de organelas à MVP. M: Mitocôndria; RER: retículo endoplasmático rugoso.

A partir de 72 h de interação, uma alta incidência de cistogênese foi observada. As figuras 5.16 A e B representam vacúolos com a membrana sendo modificada, adquirindo maior eletrondensidade e invaginações, além de conter vários parasitos com grânulos de amilopectina, indicativo de diferenciação de taquizoítos em bradizoítos. Nesta etapa do processo se mantém a conexão de organelas com a MVP (Fig. 5.16 A, B e em detalhe em C). Nota-se a presença de cistos de forma e tamanho variados, mas morfologicamente havia predominância de cistos longos adquirindo o formato da célula e se caracterizavam pela presença no seu interior de bradizoítos típicos (grânulos de amilopectina, róptrias eletrondensas, posição do núcleo, além do material eletrondenso no espaço vacuolar, compatível com o aspecto da matriz cística) (Fig. 5.16 A e B). Não foi raro se observar células contendo mais de um cisto maduro (Fig. 5.17 A), cujo detalhamento revela a proximidade e interação de organelas de astrócitos com a parede cística, que se apresenta com a membrana altamente invaginada e uma camada eletrondensa logo a baixo da membrana, correspondente à região granular, que juntos formam a parede cística (Fig. 5.17 A-E). Em contato com essa parede pode-se notar mitocôndrias e RER (Fig. 5.17 A, C-E). As imagens correspondentes às figuras 5.17 C-E e 5.18 A-C mostram em detalhes a interação de mitocôndrias diretamente à parede cística ou indiretamente sendo intermediada pelo RER que invariavelmente estão acoplados à parede cística via face lisa do RER (Fig. 5.18 B e C). Não raro foram observadas células contendo cistos, vacúolos com parasitos organizados em rosetas (etapa do ciclo lítico) e parasitos em processo de egresso das células hospedeiras (Fig. 5.19 A e B). Uma vista panorâmica das culturas é mostrada na figura 5.20 onde se observa a dinâmica assincrônica do desenvolvimento intracelular do *T. gondii* em culturas de astrócitos: células contendo dois cistos maduros (Fig. 5.20 A), células recém-infectadas com a presença de vacúolos com um único parasito (Fig. 5.20 A), células com parasitos intracelulares em processo de degradação concomitante com vacúolos ativos (multiplicação celular) e células com o ciclo lítico em estágio avançado apresentando matriz elétron-lucente (Fig. 5.20 B).

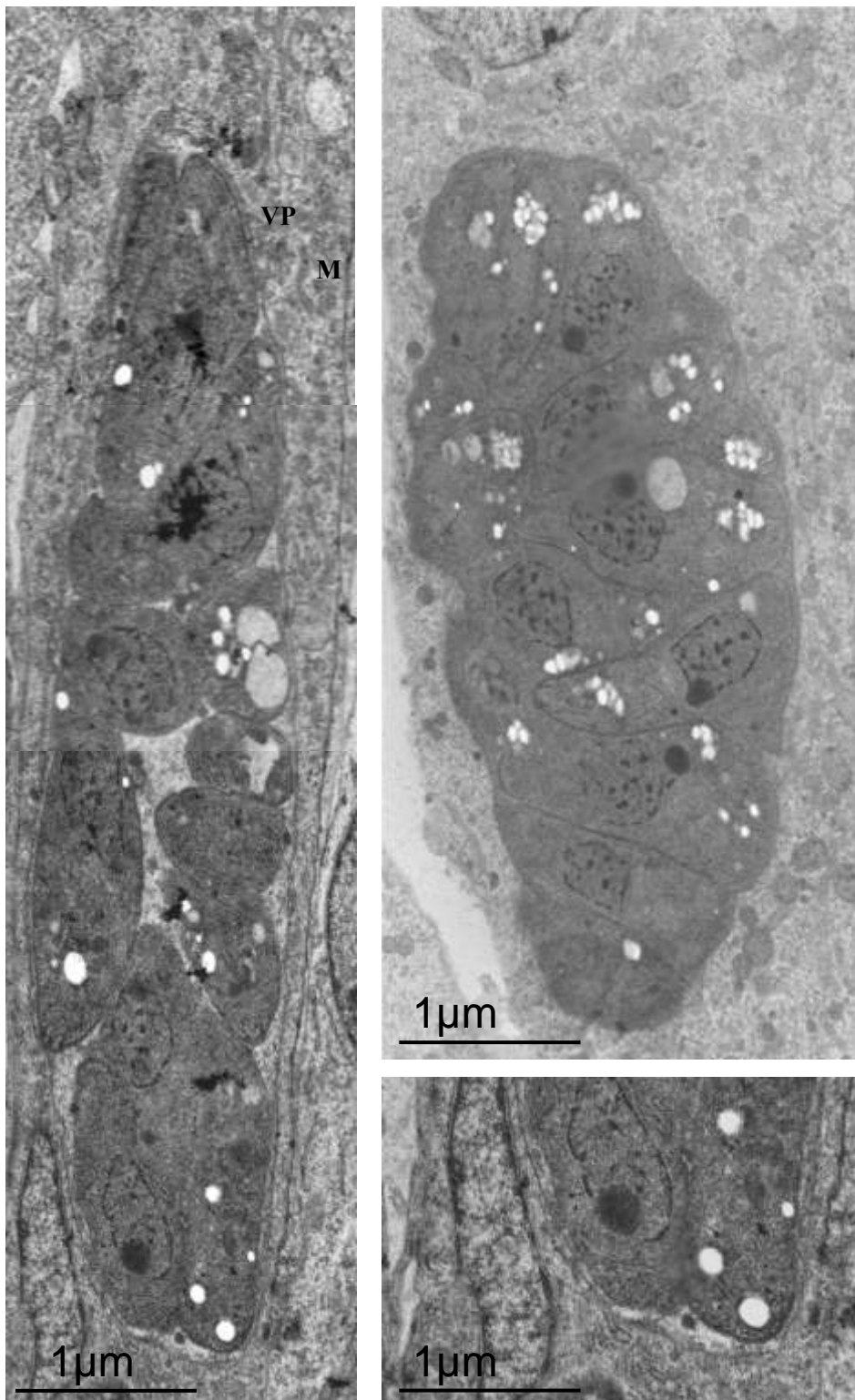


Figura 5.16 - Ultraestrutura do desenvolvimento da cistogênese de *T. gondii* em astrócitos infectados com taquizoítos da cepa ME-49, *in vitro*. (A e detalhe em C) Vacúolo contendo formas em transição e associação de organelas a MVP. (B) Cisto maduro mostrando a dinâmica de organelas de astrócitos com a parede cística. M: mitocôndria; VP: vacúolo parasitóforo.

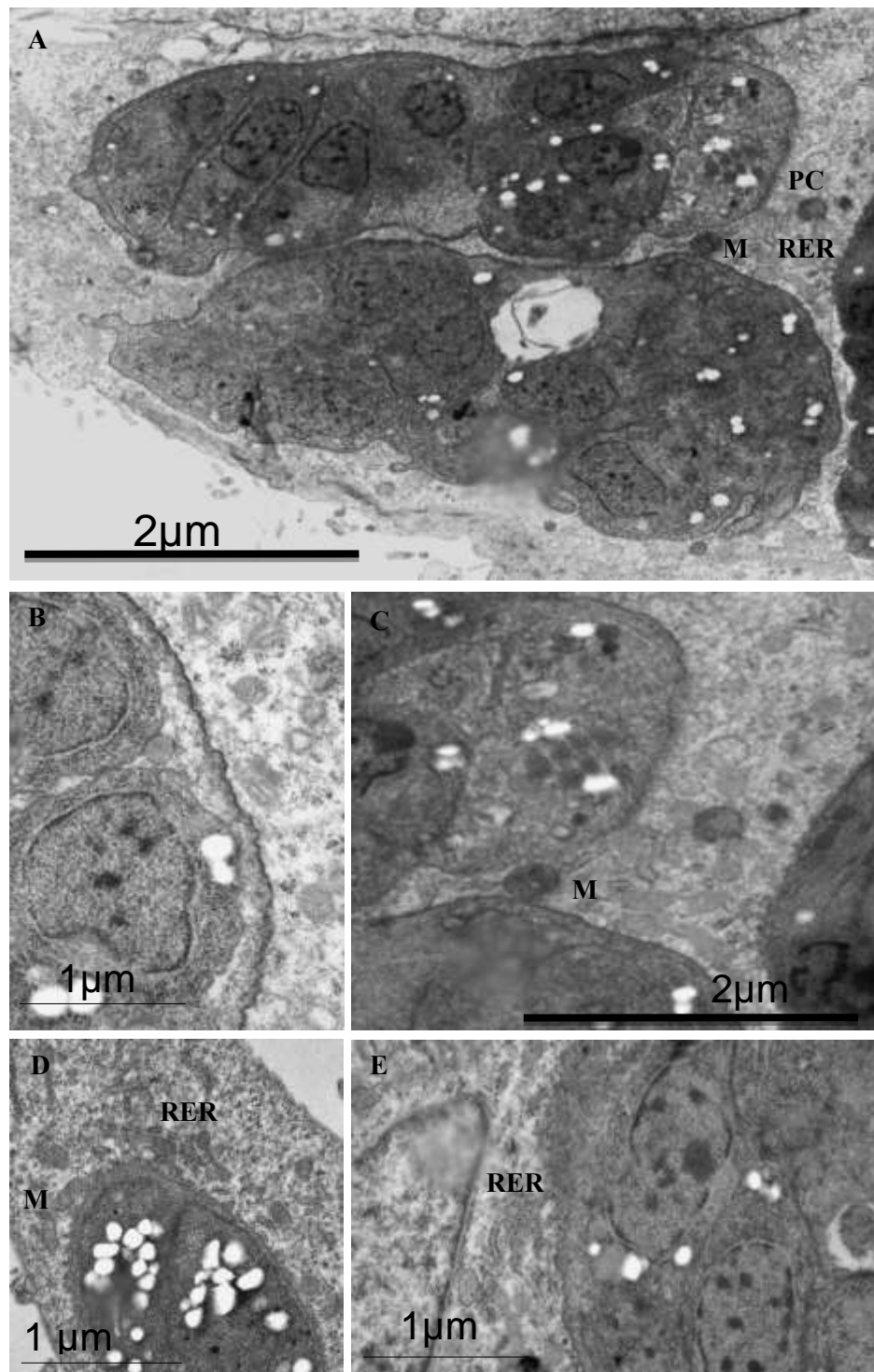


Figura 5.17 - Aspectos morfológicos de astrócitos infectados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 contendo mais de um cisto maduro, com a presença de organelas de astrócitos em interação com a parede cística (PC), assim como a interação desta com mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático rugoso (RER).

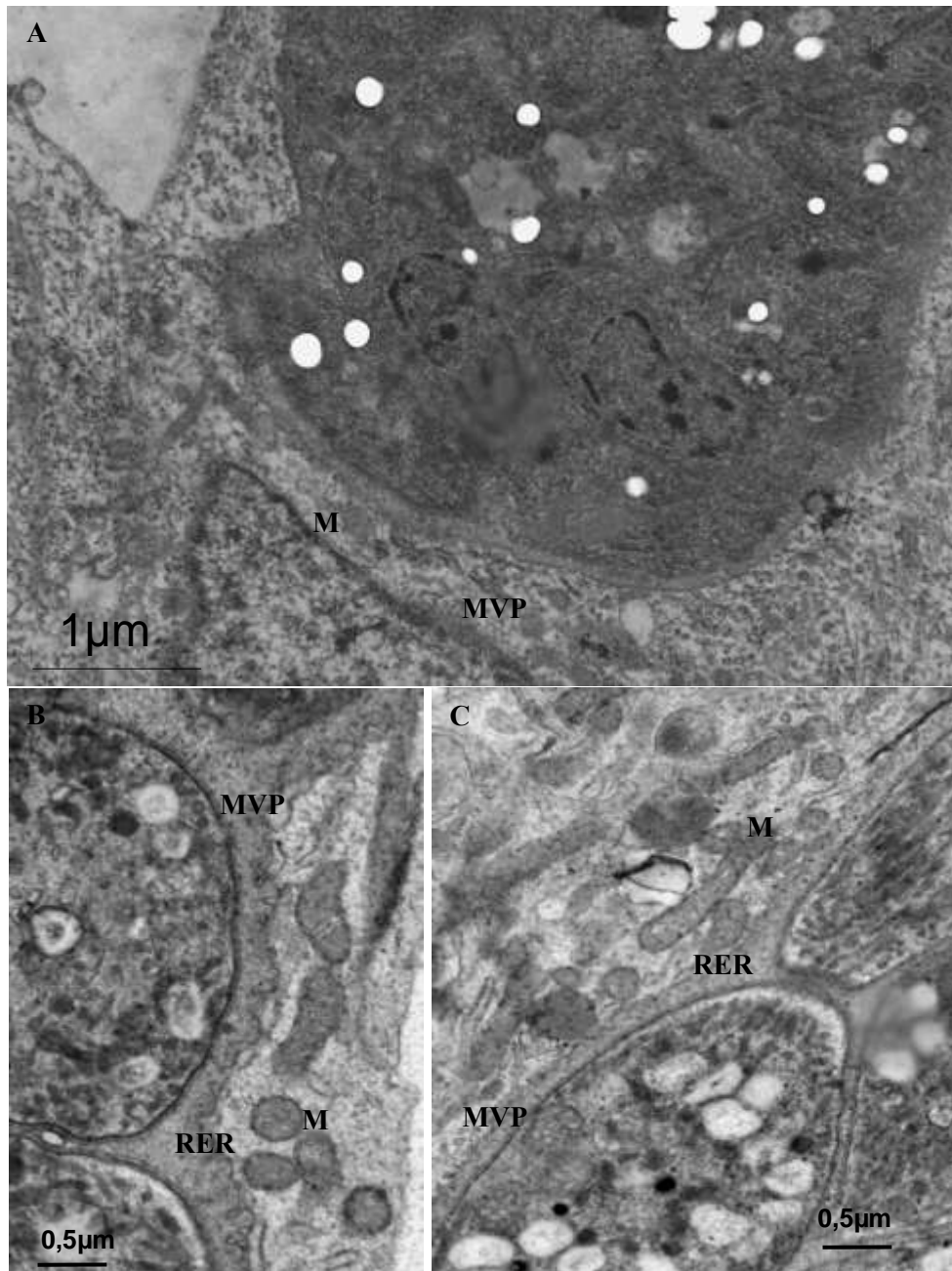


Figura 5.18 - Aspectos morfológicos de astrócitos infectados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49, mostrando a interação de mitocôndrias (M) diretamente à parede cística (A-C), ou indiretamente, sendo intermediada pelo RER (B e C).

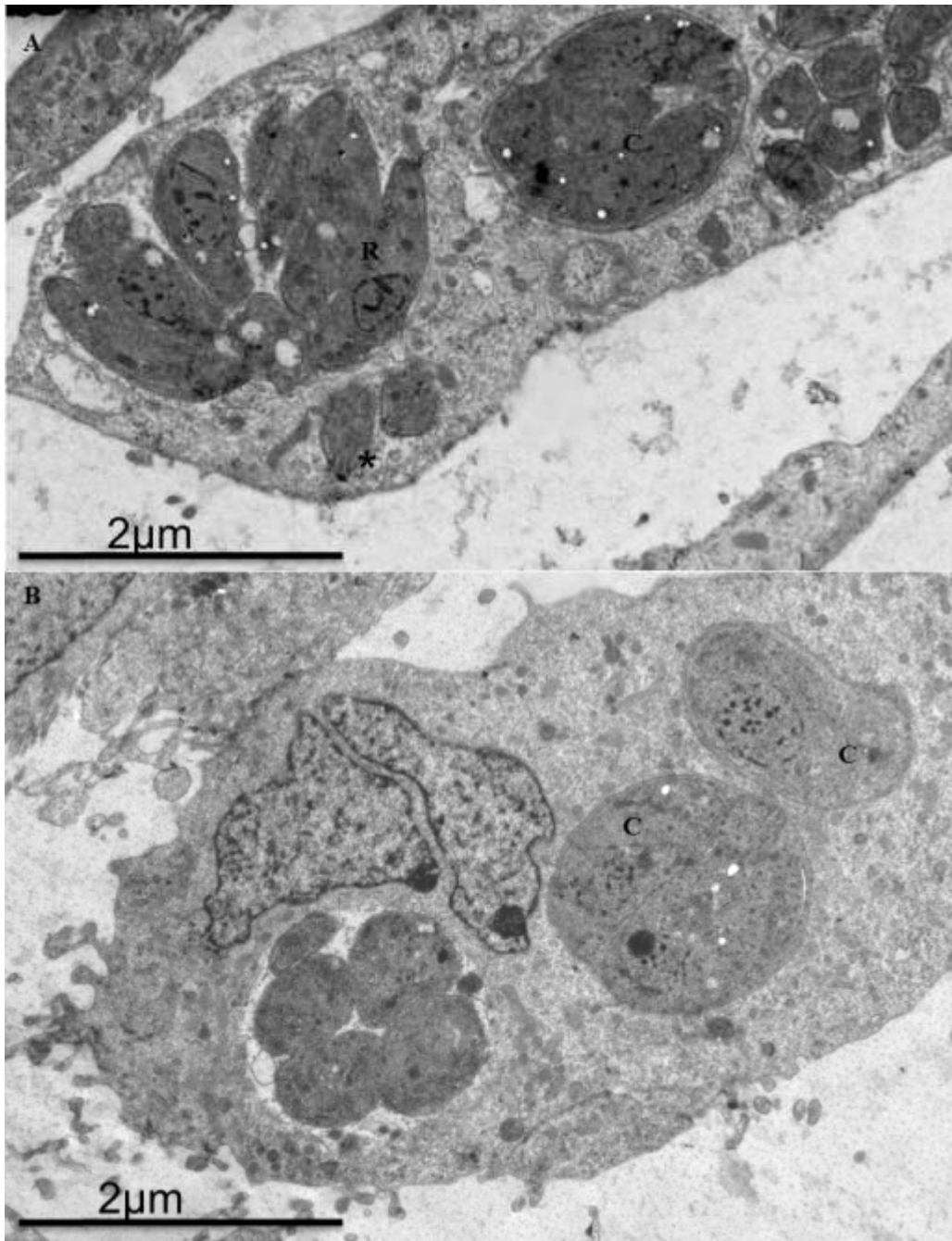


Figura 5.19 - Aspectos morfológicos de astrócitos infectados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49. (A e B) Diferentes aspectos da interação de *T. gondii* em astrócitos após 144 h. (A e B) Cistos (C), vacúolos contendo rosetas (R) e parasitos prestes a egressar da célula (*).

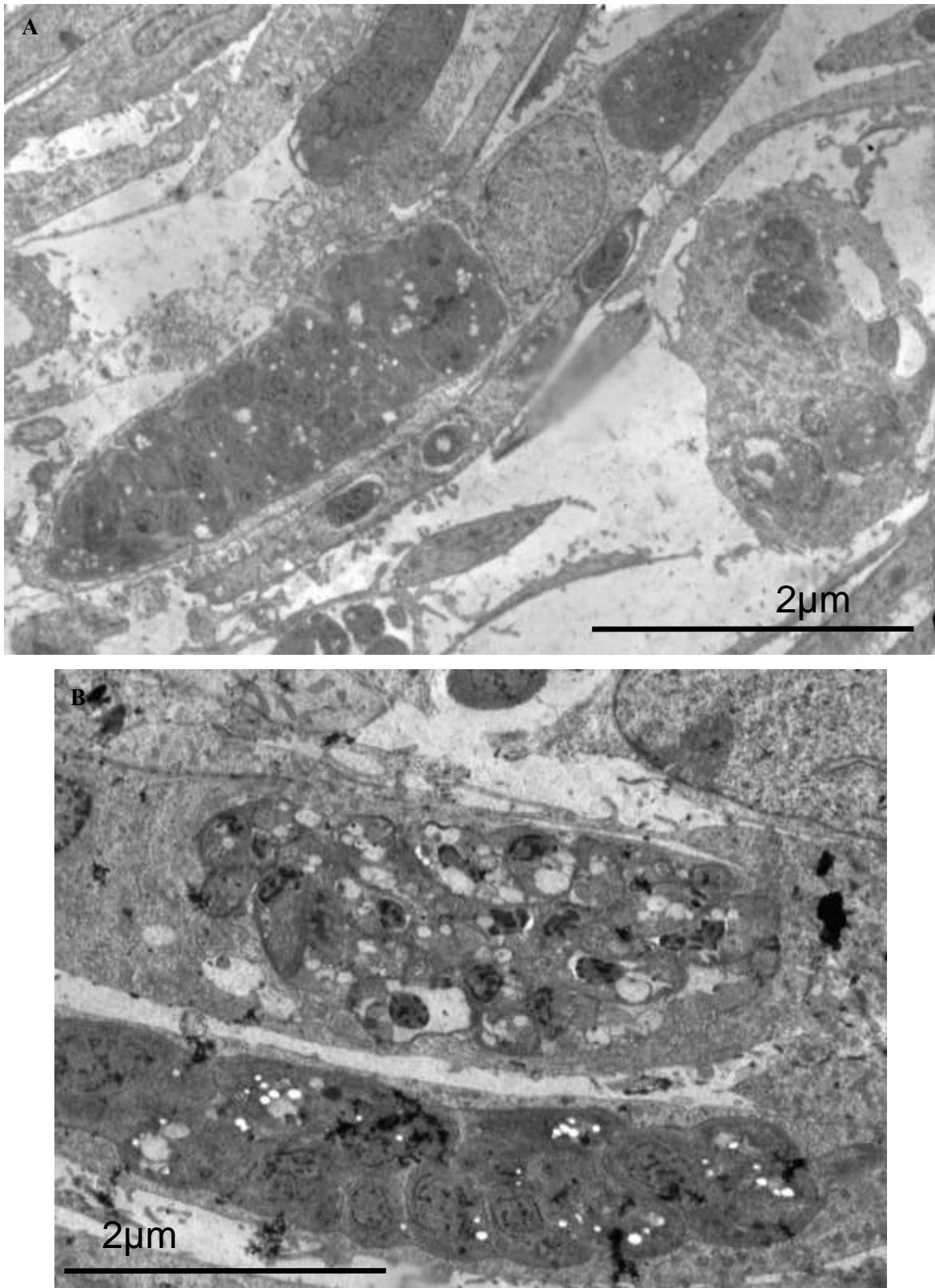


Figura 5.20 - Aspecto morfológico panorâmico de uma cultura de astrócitos mostrando o desenvolvimento intracelular de *T. gondii* (cepa ME-49) em diferentes estágios de desenvolvimento.

5.4 PARTICIPAÇÃO DE CL DE ASTRÓCITOS NA INFECÇÃO PELO *T. GONDII*

Com o objetivo de detectar lipídios neutros em culturas não infectadas e infectadas por *T. gondii*, duas sondas fluorescentes hidrofóbicas, BODIPY e Vermelho do Nilo, foram utilizadas. Vesículas positivas para lipídios foram reveladas pela coloração com Vermelho do Nilo, distribuídas no citoplasma de astrócitos não infectados, por vezes concentrados na região perinuclear, como demonstrado por microscopia de fluorescência (Fig. 5.21).

A análise ultraestrutural apontou a presença de CL durante a infecção de astrócitos e *T. gondii* mostrando o caráter osmiofílico destas organelas, ligeiramente arredondadas, de tamanhos variados e que não possuem uma bicamada fosfolipídica delimitante, como na membrana celular clássica (Fig. 5.22 A, B). Em células infectadas após 48 h, foi observada a associação de CL, além de perfis de RER e mitocôndrias, com a membrana do vacúolo contendo 2 parasitos, produto de infecção recente (Fig. 5.23 A). Células com vacúolos repletos de parasitos mantiveram esta interação com CL, por vezes interconectando dois vacúolos e em contato direto com a matriz do vacúolo e também com a membrana do parasito (Fig. 5.23 B). Culturas infectadas por 120-196 h apresentaram células com infecções múltiplas contendo vários vacúolos unitários e a associação de CL com muitos desses vacúolos e um único CL foi observado estabelecendo contato com até três vacúolos simultaneamente (Fig. 5.24A, B). Detalhe da fusão de CL com a membrana do vacúolo e sua interação diretamente com a membrana do parasito pode ser observado na Fig. 5.24 C, sugerindo que CL são recrutados e entregam seu conteúdo no interior do VP de astrócitos infectados com *T. gondii*. Nas células em que a cistogênese ocorreu, os CL foram também associados à parede cística (Fig. 5.25 A, A' inset e B).

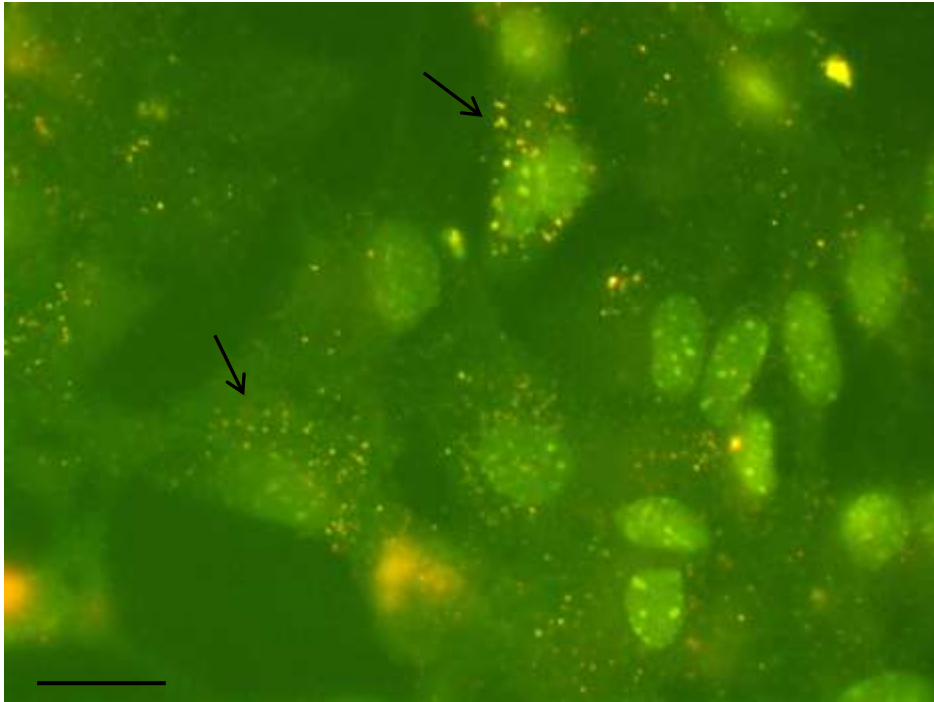


Figura 5.21 – Revelação de corpúsculos lipídicos marcados com Vermelho do Nilo (setas). Barra: 20 μ m.

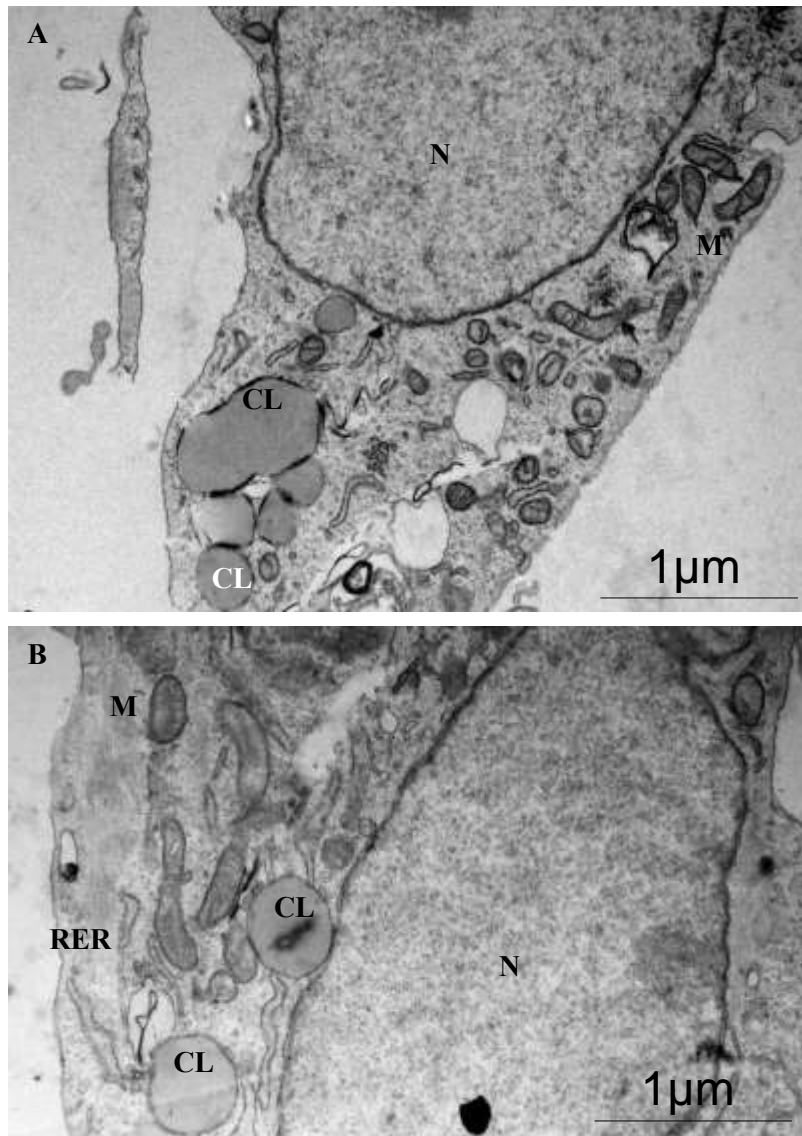


Figura 5.22 – Aspectos ultraestruturais de astrócitos contendo organelas osmiofílicas, arredondadas, com tamanhos variados e sem a presença de bicamadas fosfolipídicas, membrana clássica correspondente ao corpúsculo lipídico (CL). M: mitocôndria; N: núcleo; RER: retículo endoplasmático rugoso, (A-B).

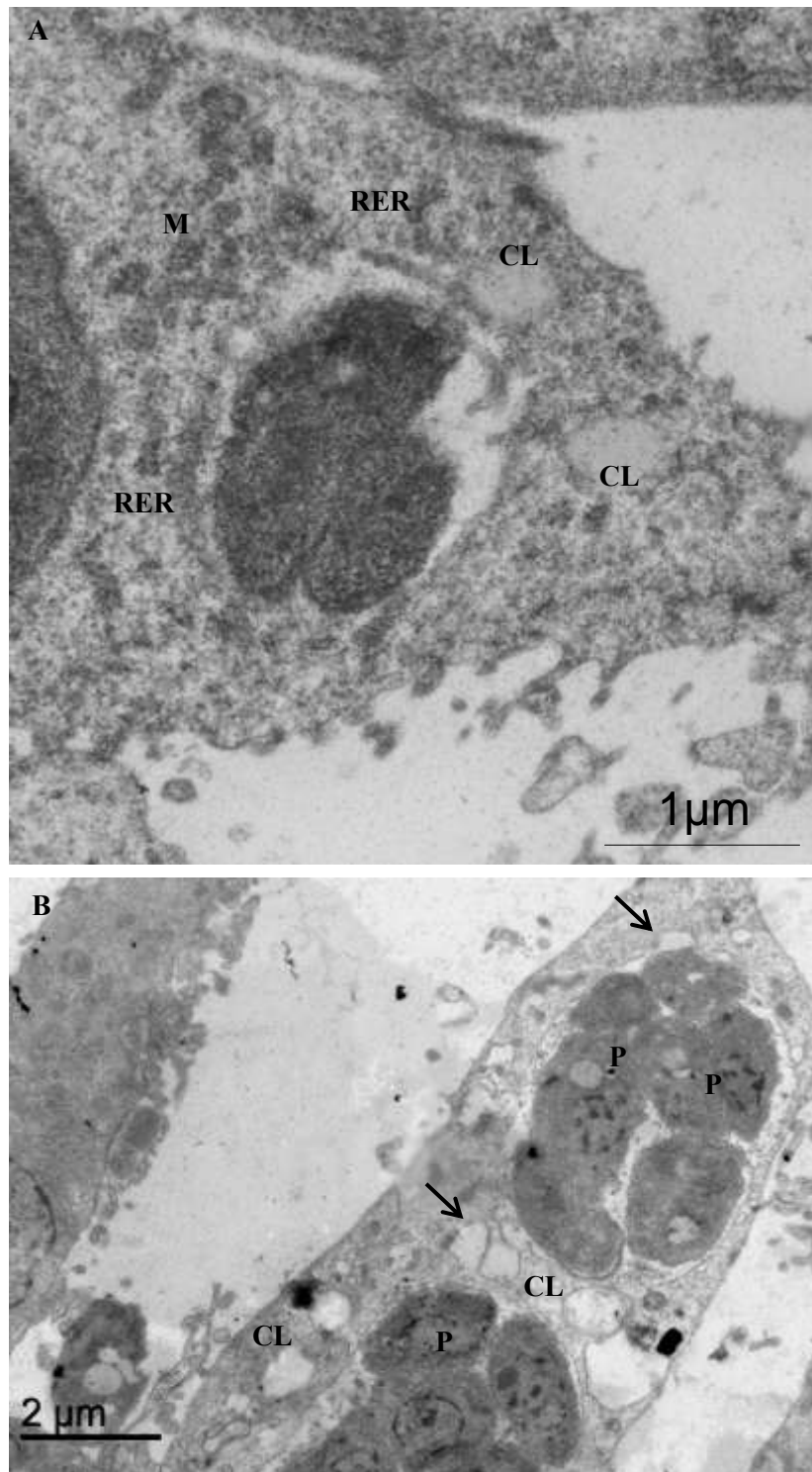


Figura 5.23 – Aspectos ultraestruturais de culturas de astrócitos infectados com taquizoítos da cepa ME-49 de *T. gondii*. Detalhe para o contato entre CL e a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP), além de RER e mitocôndrias (A). Associação direta de CL com vacúolos cheios de parasitos (B) e também integrados ao espaço vacuolar (seta). P: parasito

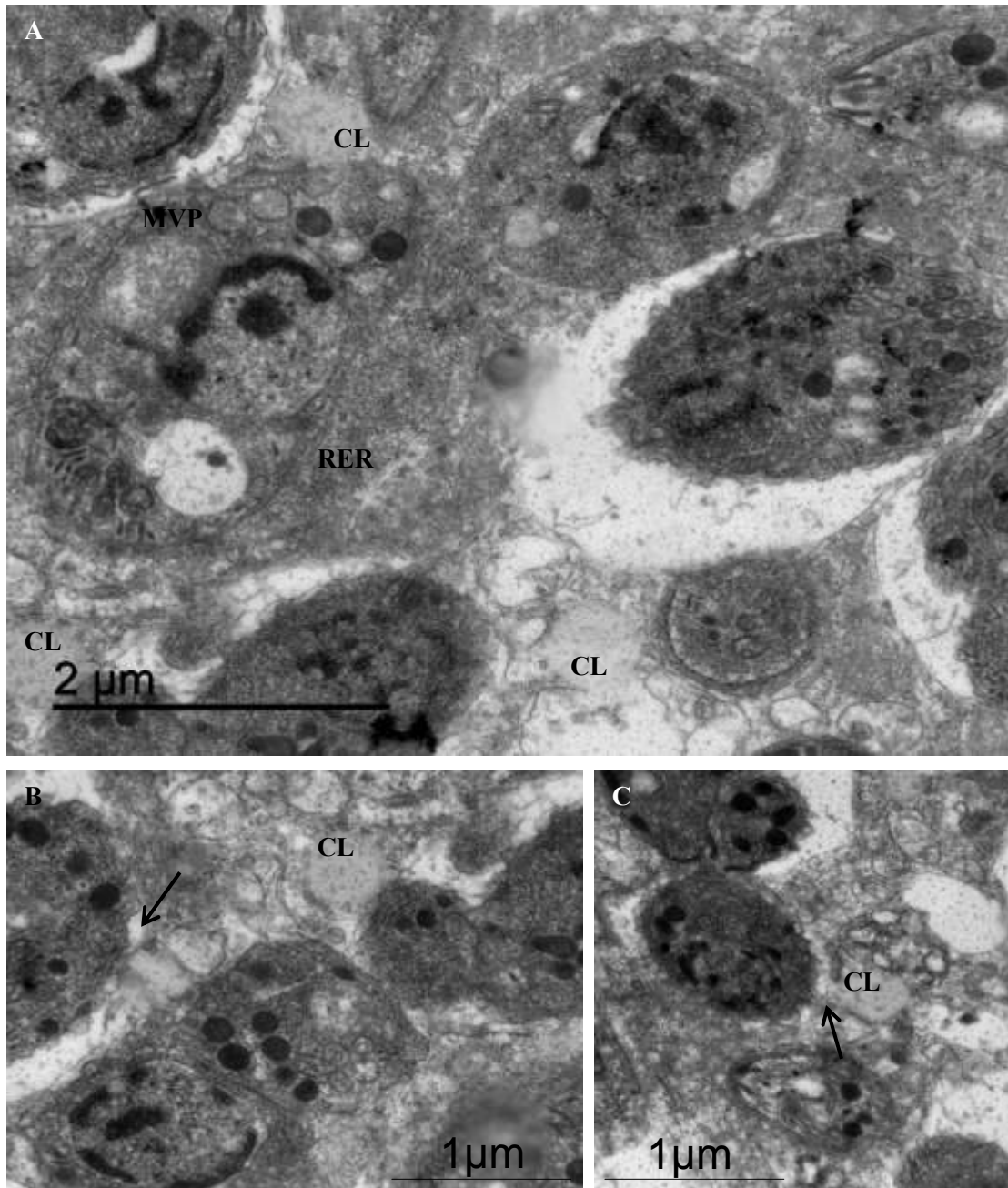


Figura 5.24 – Aspectos ultraestruturais de culturas de astrócitos infectados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 de *T. gondii*. Detalhe do contato entre CL e a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) e também integrado ao espaço vacuolar (setas), além de RER (A-C).

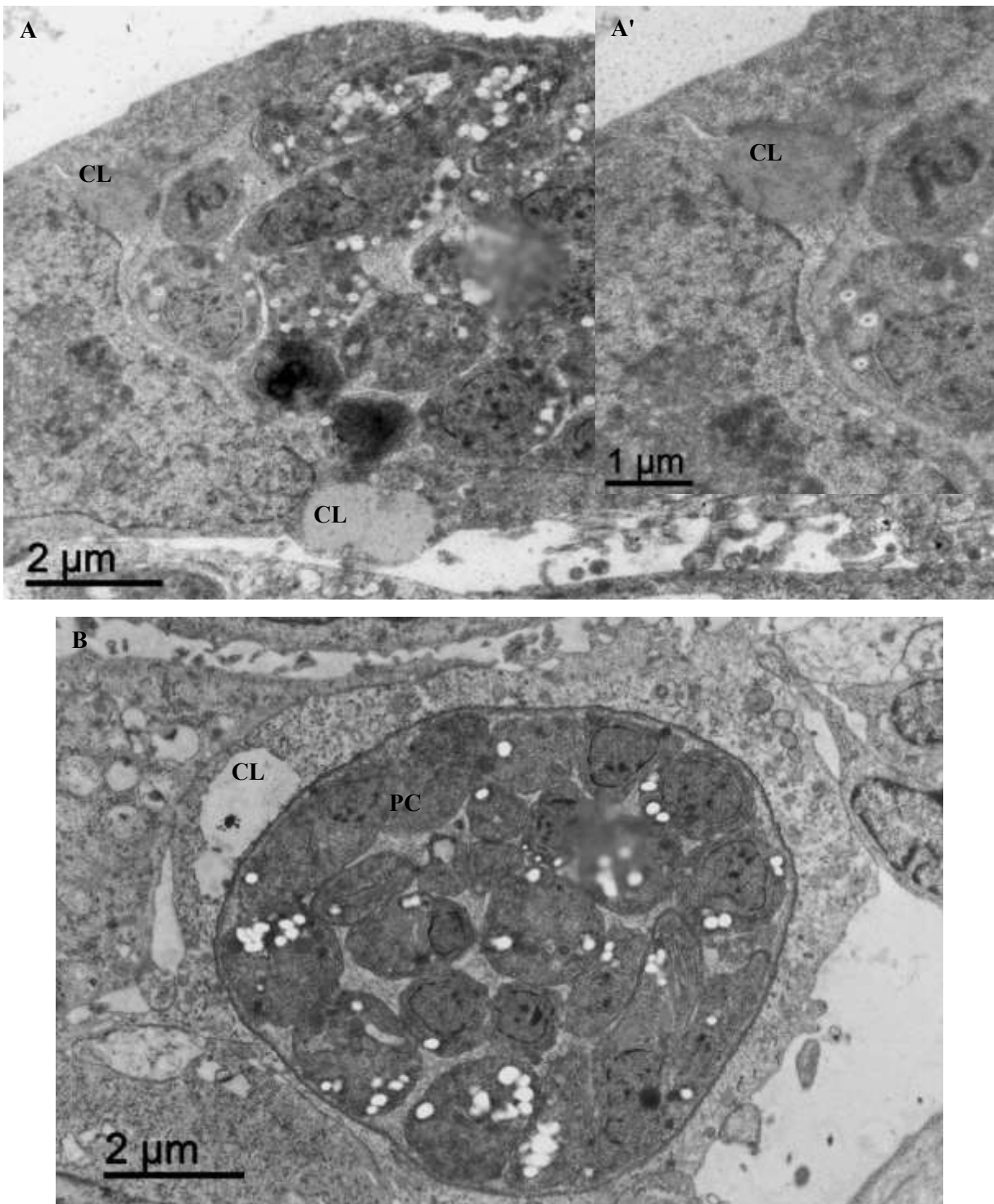


Figura 5.25 - Aspectos ultraestruturais de culturas de astrócitos infectados tachizoítos de *T. gondii* da cepa ME-49 de *T. gondii* com a presença de CL associados à parede cística (PC) (A, A' e B).

5.5 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DA PROTEÍNA GFAP DE ASTRÓCITOS DURANTE A SUA INTERAÇÃO COM *T. GONDII*

A revelação de filamentos intermediários de astrócitos não infectados por meio da distribuição da proteína GFAP mostrou a sua distribuição em rede, estendendo-se da região perinuclear para a membrana celular, incluindo as projeções celulares (Fig. 5.26 A). Algumas células apresentavam apenas a marcação na região perinuclear e nas projeções citoplasmáticas. Os astrócitos infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* mostraram diferentes perfis de distribuição dos filamentos de GFAP, pois as regiões onde se localizavam o VP mostraram um rearranjo com forte marcação em torno do VP (Fig. 5.26 B). O mesmo padrão de organização destes filamentos encontrados ao redor dos VP foi observado nas células infectadas onde a cistogênese foi estabelecida (Fig. 5.26 B e C). Contudo, a marcação de filamento intermediário de GFAP na região que circunda os cistos é mais intensa do que aquela observada em VP. A diferença na intensidade da marcação dos filamentos está possivelmente relacionada ao estágio de maturação das estruturas: quanto mais o VP se aproxima do seu estabelecimento com o cisto, mais intensa a marcação para a GFAP é detectada, sendo o máximo de intensidade observada ao redor dos cistos maduros (Fig. 5.26 C).

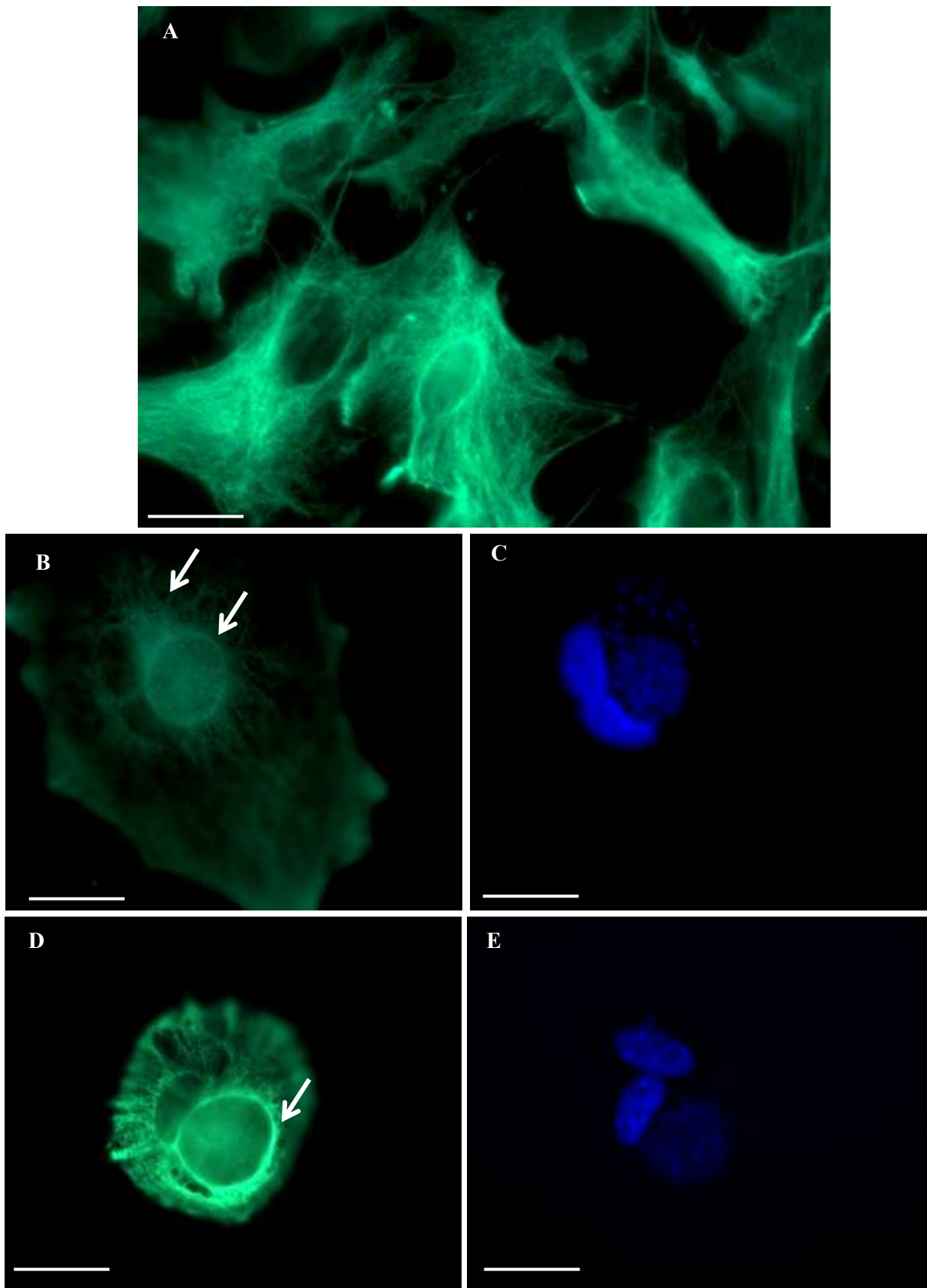


Figura 5.26 - Marcação com anticorpo contra GFAP em astrócitos. (A) Distribuição perinuclear e citoplasmática em células não infectadas com *T. gondii*. (B) Astrócitos infectados contendo vacúolo parasitóforo e cistos mostram discreta marcação em torno do VP (seta). (C) Intensa marcação em torno do cisto (seta). Núcleo: N. Barras: 20 μ m.

VI. DISCUSSÃO

Como um parasito obrigatoriamente intracelular e a sua persistência na forma dormente, como cistos teciduais, o *T. gondii* durante a fase crônica da infecção, garante a sua transmissão entre os hospedeiros intermediários e definitivos. Essa transmissão tem nichos específicos celulares considerando-se que a cistogênese ocorre preferencialmente em células do SNC e células musculares esqueléticas, com capacidade proliferativa baixa ou ausente, em função da sua diferenciação como um pré-requisito para esse processo (Coppens e Joiner, 2000; Chai *et al.*, 2001; Radke *et al.*, 2006; Swierzy e Lüder, 2015). Esta especificidade remete à sugestão de que determinados microambientes apresentam características bioquímicas que favoreçam a persistência do parasitismo no hospedeiro, e tem sido bem estabelecida tanto em sistemas *in vitro* quanto *in vivo* (Lüder *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2005; Di Cristina *et al.*, 2008; Guimarães *et al.*, 2008, 2009; Ferreira-da-Silva *et al.*, 2008, 2009a, b; Melzer *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2011; Tákacs *et al.*, 2012; Swierzy e Lüder, 2015; Gomes *et al.*, 2014; Souto *et al.*, 2016). A obtenção de altos índices de conversão e o estabelecimento da cistogênese *in vitro* foram propostos inicialmente por Soête *et al.* (1994) e Dzierszinski *et al.* (2004). Manobras experimentais, como por exemplo, o aumento de temperatura, alteração de pH, incubação com IFN- γ e outras citocinas pró-inflamatórias, resposta a estresse celular, proteínas de choque térmico e fatores de transcrição são condições que podem contribuir para a formação de cistos (Ferreira da Silva *et al.*, 2008; Swierzy *et al.*, 2014). Guimarães *et al.* (2008), Ferreira-da Silva *et al.* (2009) e Tákacs *et al.* (2012) sugerem que fatores inerentes ao tipo celular possam promover a estágio diferenciação do *T. gondii*, sem a necessidade da utilização de fatores indutores de estresse.

A presente dissertação empregou culturas de astrócitos como modelo de estudo da toxoplasmose experimental e concentrou a atenção na capacidade infectiva de *T. gondii* em astrócitos comparando duas cepas polares. Além disso, descreveu em detalhes a análise ultraestrutural desta interação, avaliando a participação de CL e a organização de filamentos de GFAP nas diferentes etapas do desenvolvimento intracelular do parasito. O interesse nessas abordagens em astrócitos tem por base a grande controvérsia do papel dessas células no desenvolvimento do *T. gondii* e a ausência de exploração do envolvimento de CL durante essa interação.

As culturas de astrócitos protoplasmáticos obtidas a partir do córtex cerebral de embriões de camundongos e após manobras, para purificação celular, foram mantidas por 10-12 dias, reproduzindo os resultados descritos por Schildge *et al.* (2013). Os astrócitos subcultivados apresentaram boa viabilidade, bem como, suas características morfológicas ultraestruturais preservadas. A caracterização dos astrócitos, nas nossas condições de cultivo, mostrou uma população de células homogêneas com citoplasma abundante, prolongamentos citoplasmáticos numerosos e curtos, núcleo grande e a presença de CL. A caracterização da maturação de astrócitos *in vitro* foi monitorada pela revelação de filamentos intermediários, que são compostos de diferentes tipos de proteínas, a depender do tipo celular, do estágio de desenvolvimento e em alguns casos do estado funcional de uma determinada célula. No caso específico dos astrócitos, as proteínas encontradas constituindo os filamentos intermediários são nestina, vimentina e a proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Nossa caracterização fenotípica revelou GFAP em astrócitos imaturos poligonais com poucos filamentos gliais, de localização perinuclear e mais intensa nos prolongamentos citoplasmáticos, enquanto os maduros apresentaram intensa marcação na região perinuclear e distribuição em rede por todo o citoplasma, de acordo com observações prévias (Manthorpe *et al.*, 1979; Sensenbrenner *et al.*, 1980; Trimmer *et al.*, 1982).

Um mapeamento mais apurado do grau de pureza dessas culturas e o diagnóstico da suscetibilidade dos diferentes estágios de maturação de astrócitos empregando marcações duplas ou triplas para as proteínas de filamentos intermediários de astrócitos teria trazido uma maior contribuição ao trabalho e merece uma atenção especial. Além disso, por meio das análises ultraestruturais foram visualizadas, além das características básicas de astrócitos, a presença de junções intercelulares do tipo “gap junction”, de acordo com a descrição de Gregorios *et al.* (1985). Essas culturas foram mantidas ativas durante os ensaios experimentais com *T. gondii*, por períodos de até 20-22 dias.

Devido às limitações do estudo da infecção de *T. gondii* em cérebros humanos, a maioria das informações que se têm é proveniente de experimentos realizados com modelos murinos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, o que foi o caso da presente dissertação.

Existe um conflito na literatura quanto à capacidade infectiva de *T. gondii* frente a astrócitos *in vivo*. A maioria dos artigos relata que neurônios seriam as células responsáveis pelo estabelecimento da toxoplasmose encefálica (Sims *et al.*, 1989) ou as principais células, considerando-se que algumas células da glia eventualmente eram encontradas infectadas,

incluindo astrócitos (Ferguson e Hutchison (1987 a, b). Além da questão da infectividade, outro aspecto crucial era a capacidade de astrócitos estabelecerem a cistogênese. Essa discussão já ocorria nos trabalhos de Sims *et al* (1989), que também realizaram um estudo *in vivo* e com base na histologia, os autores confirmaram cistos apenas em neurônios. Estudos ultraestruturais anteriores (Ferguson e Hutchison, 1987a,b) mostraram uma predominância de cistos em neurônios no cérebro de camundongos infectados cronicamente. Em 2010, Melzer e colaboradores avaliaram a contribuição de cada tipo celular do cérebro durante a cistogênese de *T. gondii*. Os autores ainda avaliaram que a marcação de astrócitos com GFAP varia dependendo do subtipo e localização destas células no cérebro, sendo assim, era possível ter cistos em astrócitos, mas devido ao baixo nível de detecção da marcação, não foram identificados.

Mais recentemente, estudos *in vivo* conduzidos por Cabral *et al.* (2016), camundongos foram infectados intraperitonealmente com duas cepas de *T. gondii*, Prugniaud (avirulenta) e CEP (virulenta) e os cérebros foram analisados em períodos de 0,5 a 12 semanas pós-infecção. A fim de estabelecer mais fidedignamente os tipos celulares envolvidos nesta infecção, astrócitos foram marcados com anticorpos contra GFAP e S100 β . Seus resultados indicaram que os cistos foram encontrados principalmente em neurônios, no entanto, astrócitos também apresentavam infecção.

Entretanto, os ensaios *in vitro* de diversos grupos empregando culturas primárias de astrócitos, contendo percentuais variados de neurônios e outras células gliais, apontaram a alta suscetibilidade de infecção e de formação de cistos em astrócitos frente a diferentes perfis de cepas de *T. gondii* (Halonen *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 1997; Creuzet *et al.*, 1998). Em uma revisão sobre o desenvolvimento diferencial de *T. gondii* em células neuronais, Fagard *et al.* (1999) endossaram a sugestão dada por Creuzet *et al.* (1998) e Halonen *et al.* (1996) para explicar a maior infectividade de astrócitos em relação aos neurônios: o pequeno tamanho dos neurônios comparado aos astrócitos permitiria o desenvolvimento de vacúolos e cistos maiores e com mais parasitos nos astrócitos; a divisão celular também implicaria na baixa infectividade de neurônios, uma vez que não há divisão celular nessas células, e um estudo conduzido por Grimwood *et al* (1996) teria sugerido que a ligação dos taquizoítos à superfície celular aumenta durante o meio da fase S (síntese) do ciclo celular. Desta forma, a expressão de receptores de superfície celular seria maximizada durante esta fase do ciclo, potencializando, portanto, a infecção.

Em uma revisão sobre os experimentos realizados abordando a invasão de *T. gondii* em astrócitos *in vitro*, Contreras-Ochoa *et al* (2012) descreveram que a alta diversidade de resultados observada nesses ensaios é em decorrência da heterogeneidade de metodologias utilizadas, ou seja, modelos animais diferentes, diversidade de cepas (virulentas e avirulentas), tamanho do inóculo do parasito e diferentes tempos de análises pós-infecção. Os métodos de análise constituem um fator de influência nesses experimentos: alguns autores informam apenas o percentual de células infectadas, enquanto outros são mais refinados, avaliando a quantidade de parasitos por vacúolo ou célula ou apenas a quantidade de vacúolos por célula. Diante dessa diversidade de protocolos e de resultados divergentes, um dos desafios dessa dissertação foi avaliar, nas nossas condições experimentais, o comportamento de duas cepas polares de formas taquizoítas de *T. gondii*, com diferentes cargas parasitárias frente à cultura primária de astrócitos, num curso de tempo que variou de 24 a 196 h.

Astrócitos *in vitro* suportam o desenvolvimento de taquizoítos e bradizoítos (Halonen *et al.*, 1996). De acordo com os resultados de culturas mistas de cérebros de fetos humanos, avaliados em 24 e 48 horas, astrócitos e neurônios foram infectados, mas a porcentagem de astrócitos infectados foi 2 a 3 vezes maior do que neurônios. No mesmo período, também constataram que a replicação de *T. gondii* foi de 2 a 4 vezes maior em astrócitos, apresentando maior quantidade de vacúolos e maior número de parasitos por vacúolo em relação aos neurônios. A replicação de *T. gondii* em astrócitos resultou em sua lise após 2 a 3 dias de infecção. Em nossos experimentos com a cepa ME-49, observamos certa semelhança, onde após 48 h de infecção ocorreu uma pequena queda no percentual de infecção, possivelmente devido à lise de células, que só tornou a aumentar no tempo de 120 h.

Ainda, Halonen *et al* (1996) descreveram a presença de cistos a partir de 48 horas nos dois tipos celulares e, em geral, os cistos em neurônios eram pequenos, enquanto em astrócitos eles tinham em média 100 μm e com centenas de parasitos. Um dado adicional, foi a observação de que os cistos em astrócitos se rompiam, liberando bradizoítos entre 96 e 120 horas de infecção, demonstrando que cistos em neurônios eram mais estáveis do que em astrócitos. A cistogênese em nossas condições experimentais ocorreu a partir de 72 horas nas duas cepas utilizadas, sendo observados cistos grandes, contendo centenas de bradizoítos, o que corrobora o que foi apontado por Fagard *et al.* (1999) de que o grande tamanho dos astrócitos possibilitaria que essas células albergassem cistos de grandes proporções e contendo centenas de bradizoítos. Nossos resultados foram gerados por meio de imagens de

microscopia óptica para ambas as cepas, por análises citoquímicas utilizando a lectina DBA, marcador de parede cística e ainda por análise ultraestrutural para a cepa ME-49. É interessante ressaltar que apesar da cepa RH ser conhecida por não formar cistos, obtivemos indícios morfológicos de enormes estruturas que se assemelham muito a cistos. A conversão espontânea da cepa RH de taquizoíto-bradizoíto em astrócitos não foi surpresa, tendo em vista que nosso grupo, já havia descrito esse evento em células musculares esqueléticas, sem qualquer manobra experimental, o que reforça a ideia de que o microambiente celular possa ser um dos indutores da cistogênese (Ferreira-da-Silva *et al.*, 2009).

Creuzet *et al.* (1998) utilizaram culturas mistas de hipocampo de ratos neonatos com o objetivo de avaliar o desenvolvimento de *T. gondii* em diferentes tipos celulares. Estas culturas foram infectadas com taquizoítos da cepa virulenta, RH na proporção 1:1 (parasito-célula-hospedeira). Os diferentes tipos celulares foram identificados através da marcação específica com anticorpos, e as culturas mistas eram compostas por 70% células gliais e 30% neurônios. Os resultados foram analisados por imunofluorescência 24 horas após a infecção e mostraram uma alta porcentagem de células gliais infectadas, que abrigavam 2 a 4 vacúolos contendo 1 a 8 parasitos. Obtivemos resultados semelhantes, em que astrócitos infectados com a cepa RH e analisados em 24 h e na relação 1:1 possuíam entre 1-2, 3-6 vacúolos albergando parasitos. Apesar da porcentagem de células contendo 3-6 vacúolos ter sido baixa em nossos experimentos para esse tempo, esta aumentou posteriormente, bem como de células contendo 7 ou mais vacúolos. Um diferencial nos nossos experimentos foi que utilizamos os córtices para isolamento de astrócitos e camundongo ao invés de rato. Maiores comparações com os experimentos desses autores não puderam ser realizadas uma vez que suas análises se restringiram ao tempo de 24 horas, enquanto nossas análises se prolongaram por 144 horas pós-infecção. Em relação à cepa ME-49, células contendo entre 1 e 2 vacúolos quase não variaram, apresentaram apenas uma leve queda de percentual no período de 144 h, enquanto células contendo entre 4-6 vacúolos também não variaram muito em ambas as relações parasito-astrócito. As células contendo 7 ou mais vacúolos mostraram um baixo percentual com 24 h, o que já era esperado, devido ao pouco tempo de infecção, mas aumentaram ao longo do percurso, apresentando um bom percentual com 120 e 144 h, possivelmente devido a ciclos líticos ocorridos anteriormente, o que permitiu que vários parasitos invadissem novas células, aumentando assim o número de vacúolos das mesmas.

Visando verificar a contribuição quantitativa de neurônios, astrócitos e microglias no desenvolvimento intracerebral de *T. gondii*, Lüder *et al.* (1999) realizaram experimentos *in vitro* e analisaram a invasão das células hospedeiras, a replicação intracelular e a conversão do estágio taquizoíta para bradizoíta. As culturas, feitas a partir dos córtices de embriões de ratos Wistar, foram infectadas com taquizoítos da cepa avirulenta NTE nas razões 1:1 e 1:3. Com 48 h de infecção, constataram que pelo menos de 1/3 dos vacúolos parasitóforos presentes em neurônios e astrócitos continham pelo menos 4 a 8 parasitos, enquanto esse número era visto em menos de 7% das microglias, que possuíam em geral 1 a 2 parasitos por vacúolo. Um dado interessante desse grupo foi a descrição de que estes parasitos intracelulares pareciam degenerados, enquanto em neurônios e astrócitos pareciam estar se desenvolvendo normalmente. Dessa forma, os autores concluíram que a replicação de *T. gondii* era sustentada principalmente por neurônios e astrócitos, enquanto as microglias podiam inibir o desenvolvimento *in vitro* do parasito. Além da conversão de taquizoítos para bradizoítos vistas 4 dias pós-infecção, constataram a presença de bradizoítos nos três tipos celulares, porém a quantidade era maior em neurônios, seguido por astrócitos e microglias. Culturas foram examinadas por marcação com dupla imunofluorescência, e neurônios foram identificados como o tipo celular predominante, seguido por astrócitos e microglias. Após dois dias da infecção, parasitos intracelulares foram encontrados nos três tipos celulares, mas revelaram que a porcentagem de microglias infectadas era três vezes maior do que em neurônios e astrócitos, indicando que *T. gondii* invade preferencialmente esse tipo celular. Ao avaliar o desenvolvimento intracelular e morfológico dos parasitos após 2 dias de infecção com a cepa avirulenta (ME-49), encontramos uma alta porcentagem de vacúolos contendo entre 1-3 parasitos na relação 1:1, sendo que somente na relação 5:1 obtivemos um maior percentual de vacúolos contendo entre 4-8 parasitos.

Em relação à conversão de taquizoítos para bradizoítos, os dados de Lüder *et al.* (1999) diferem dos nossos, onde encontramos cistos somente a partir de 72 h tanto na cepa avirulenta quanto na virulenta. Em seus resultados, Lüder e colaboradores ainda demonstraram que o emprego de IFN- γ não interferiu no desenvolvimento da cistogênese de *T. gondii* no tempo de 96 h, sugerindo que este processo ocorra espontaneamente. Por outro lado, Jones *et al.* (1986) apontaram que IFN- γ seria um mediador para a estabilização de cistos em culturas primárias de astrócitos murinos de longo prazo, uma vez que controlam a divisão de taquizoítos. Sabe-se que essa é a principal citocina de controle do crescimento de *T. gondii* no cérebro (Suzuki *et al.*, 1989). Como não utilizamos nenhum fator que pudesse

interferir na cistogênese em astrócitos nas nossas culturas, esse parâmetro não pode ser comparado.

A influência da carga parasitária também foi decisiva para o desenvolvimento e diferenciação do parasito durante a interação *T. gondii*-astrócitos. Infectando os astrócitos com taquizoítos da cepa ME-49, na relação 1:1 e 5:1 (parasito-célula hospedeira) foi observada a conversão de taquizoítos em bradizoítos em 72 h pós-infecção. Essa conversão é um processo natural que ocorre nas primeiras 15 h de infecção em culturas, sem a adição de substâncias imunomoduladoras (Gross *et al.*, 1996). Entre 72 e 96 h de infecção foram observados muitos parasitos no meio extracelular e lise das células, caracterizando o ciclo lítico do *T. gondii*, ratificando os resultados obtidos por Dzierszinski *et al.* (2004) que observaram lise celular neste mesmo período em linhagens celulares de diferentes origens.

As análises ultraestruturais de astrócitos infectados com taquizoítos realizadas por períodos que variaram de 48 a 196 h de interação mostraram assincronismo dos eventos que regem essa interação. Em função disso, a mesma cultura infectada a partir de 72 h permitiu o acompanhamento dos eventos iniciais e do desenvolvimento intracelular do parasito, quer durante o ciclo lítico, quer durante a cistogênese. No presente trabalho, pudemos identificar: (i) adesão do taquizoíto à superfície de astrócitos, mediada pela região apical num típico processo de penetração ativa. Os mecanismos motores e moleculares que se estabelecem nesta adesão e invasão do *T. gondii* foram revistos por Tardieux e Baum (2016) integrando conceitos antigos e novos para uma melhor compreensão da arquitetura motora que determina a invasão do parasito na célula hospedeira. Este é um tópico da biologia celular e molecular do parasito ainda pungente; (ii) VP característicos de infecção recente, apresentando um taquizoíto no seu interior; (iii) VP contendo parasitos em duplas, indicativo de processo de divisão celular recente, e/ou apresentando vários parasitos por VP numa típica multiplicação ativa; (iv) VP com parasitos em processo de transição de taquizoíto para bradizoítos; (v) cistos teciduais em diferentes estágios de maturação; (vi) células contendo mais de um vacúolo, às vezes muitos vacúolos com um único parasito, ao lado de vacúolos repletos de parasitos ou ainda, (vii) a presença simultânea de cistos nessas células. Essa variação de “estágios infectivos” demonstra claramente a falta de refratariedade a novas infecções numa mesma célula (infecções múltiplas atemporais), e o desenvolvimento intracelular do parasito assincrônico. Esses eventos já têm sido reportados com outros tipos celulares, como a célula muscular esquelética e células epiteliais de diferentes origens (Guimarães *et al.*, 2008, 2009;

Paredes-Santos *et al.*, 2013; De Munro, 2015; Garcia, 2016).

A análise ultraestrutural comparando astrócitos não infectados e infectados mostrou uma resposta celular imediata, como um processo dinâmico, que ocorre logo após a sua invasão por taquizoítos. Mitocôndrias perdem sua organização original dispersa pelo citoplasma e se deslocam para a região onde se localiza o VP e cistos, adquirindo uma distribuição radial em torno dessas estruturas. Esse tropismo de mitocôndrias da célula hospedeira durante a infecção é uma questão ainda não bem esclarecida. Alguns autores consideram que as mitocôndrias nas proximidades do VP seria um evento determinado pela falta de espaço durante o desenvolvimento do parasito na célula hospedeira (Magno *et al.*, 2005b). Os astrócitos têm uma área citoplasmática grande e a migração tem sido observada em células contendo um único vacúolo. Desta forma, esta reorganização espacial, não poderia ser uma casualidade e muito provavelmente deve envolver vias moleculares de sinalização do parasito que induza essa atração. Assim, estas hipóteses encontram respaldo nos dados descritos nesta dissertação e também nos dados acumulados pelo nosso grupo com diferentes tipos celulares (Andrade *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2014; de Oliveira, 2014; Garcia, 2016).

A associação das mitocôndrias com o VP e cistos se estabelece: via adesão direta com a MVP ou PC e/ou indireta, mediada por RER. No caso de VP, estas observações estão em consonância com outros grupos de pesquisa que avaliaram essa interação principalmente em macrófagos, enquanto a associação de organelas durante a cistogênese, tem sido muito pouco explorada e se limita a um artigo de Lindsay (1998) com fibroblastos, pouco conclusivo devido à qualidade do material apresentado. Recentemente, nosso grupo empregando células Vero num estudo ultraestrutural mais refinado mostrou detalhes desta interação com cistos (Garcia, 2016). Jones *et al.* (1972) e Sinai e Joiner (1997) demonstraram que esta associação sempre se estabelecia de forma direta mitocôndrias-MVP. Estudos desenvolvidos por Magno *et al.* (2005) por meio de análises de reconstrução 3D e quantitativa, consideram que a via de associação predominante seria mitocôndrias-RER-MVP. Nossos resultados empregando astrócitos, células epiteliais e células musculares esqueléticas corroboram em parte esses dados e estão mais alinhados à literatura, sendo que dois tipos de associação foram detectados: (i) mitocôndrias com associação direta com a MVP ou PC, localizando-se muitas vezes, entre as cisternas do RER, tendo em vista que vários perfis de RER circundam os vacúolos e cistos; (ii) associação indireta, mediada por RER. A orientação do RER com a face lisa associada à MVP ou PC e a face rugosa voltada para o citoplasma de astrócitos nos

remete aos estudos que avaliam a importância da associação do RER com o VP de *T. gondii* e do papel dessa organela como responsável pelo tráfego de substâncias entre o parasito e a célula hospedeira (Magno *et al.*, 2005; Goldszmid *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2014). Goldszmid *et al.* (2009) mostram que a associação do RE de células dendríticas com o VP caracteriza uma nova via de apresentação cruzada de antígenos. Este evento explicaria a capacidade de hospedeiros imunocompetentes de controlar a infecção pelo *T. gondii*. Desta forma, propomos que o RER se associe com o VP e aos cistos sempre sob esta orientação, pois a face lisa é responsável pela síntese de vesículas exocíticas e de transporte intracelular. Assim, por meio desta via o parasito obtém e envia informações e substâncias para outros vacúolos, organelas da célula hospedeira e para o meio extracelular. Esta associação induzida pelo parasito explicaria muito do crescimento da MVP e do parasito durante sua proliferação e desenvolvimento intracelular, como já proposto por De Melo *et al.* (1992), De Melo e de Souza (1997) e Gomes *et al.* (2014). A identificação da estreita associação de organelas de astrócitos durante a cistogênese de *T. gondii* é pioneira e agrega subsídios que permitem a melhor compreensão da fonte de nutrientes requerida pelos parasitos nesse período de sua permanência no interior de cistos por toda a vida do hospedeiro.

Até o momento, os estudos que avaliam as moléculas candidatas envolvidas na interação de mitocôndrias durante a interação de *T. gondii* na célula hospedeira se restringem à sua associação com MVP. Estas moléculas seriam as proteínas ROP2a, ROP2b e ROP8 (secretadas pelas róprias, que constituem uma família de cerca de 18 proteínas, com distintas funções na infecção) atuando como mediadoras desta associação via interações hidrofóbicas e iônicas (Beckers *et al.*, 1997; Sinai e Joiner, 2001; Nakaar *et al.*, 2003; El Hajj *et al.*, 2006, 2007; Labesse *et al.*, 2009; Reese e Boothroyd, 2009; Pernas *et al.*, 2014). Pernas e Boothroyd (2010) mostraram que após a depleção dos genes para estas proteínas, em taquizoítos da cepa RH, a associação mitocôndria e MVP se mantêm, o que contraria os resultados descritos pelo grupo do Nakaar. Os autores propõem que possa ter ocorrido uma depleção “off-target” de outros membros da grande família de proteínas da ROP2 gerando esse resultado conflitante. Independentemente dessa discussão a respeito da(s) molécula(s) responsável (eis) pela associação entre mitocôndrias da célula hospedeira e o VP, nossos dados obtidos com taquizoítos/bradizoítos/cistos não só comprovam a associação como, também, reforçam a ideia de que esse evento não seria ocasional (Gomes *et al.*, 2014; de Oliveira, 2014; Garcia, 2016; Tahara *et al.*, 2016). Mais recentemente, corroborando essa hipótese, foi identificado um fator de associação mitocondrial (TgMAF1) como uma molécula

mediadora da associação mitocôndria - MVP de *T. gondii* (Pernas *et al.*, 2014).

Durante o desenvolvimento de taquizoítos em astrócitos, além da associação de mitocôndrias e RER à MVP, há no período de proliferação celular um aumento da rede túbulo-vesicular (RTV) como descrito em células epiteliais (Magno *et al.*, 2005b; Lemgruber *et al.*, 2008; De Oliveira, 2014). É de amplo conhecimento que a MPV é modificada bioquimicamente por uma intensa exocitose de moléculas das róprias e dos grânulos densos (Brossier *et al.*, 2005), que as proteínas GRA2, GRA3 e GRA6 possuem um papel fundamental na formação dos túbulos, que darão origem à RTV madura, e que a GRA6 é responsável pela estabilização desta rede (Mercier *et al.*, 2002; Caffaro e Boothroyd, 2011). Além disso, várias dessas proteínas modificam a membrana do vacúolo parasitóforo, através da formação de poros, permitindo a difusão bidirecional de moléculas de até 1.2 kDa, entre o vacúolo e o citoplasma da célula hospedeira (Cesbron-Delauw, 1994; Schwab *et al.*, 1994). De fato, o aumento dessa rede durante o desenvolvimento do parasito deverá aumentar o trânsito de substâncias entre parasito e o citoplasma da célula hospedeira, como fonte de nutrientes e fatores necessários a manutenção de *T. gondii* intracelular.

O processo de cistogênese em astrócitos foi monitorado ultraestruturalmente. Os parasitos no interior dos cistos teciduais apresentaram características morfológicas de bradizoítos, com grande quantidade de grânulos de amilopectina, como descritos por Dubey *et al.* (1998). Foi possível verificar o aumento da eletrondensidade tanto da estrutura da parede quanto da matriz cística à medida que estes cistos amadureciam. Estas observações estão de acordo com a descrição da maturação de cistos nos sistemas *in vivo* e *in vitro* (Ferguson e Hutchison, 1987; Paredes-Santos, 2015; Garcia, 2016). Durante o processo de cistogênese observou-se a escassez de RTV, que parece ser degradada e substituída por um material amorfo, granular e eletrondenso, caracterizado como a matriz cística. A depender do tipo celular, a matriz adquire maior eletrondensidade, como é o caso de células Vero (Garcia, 2016). Se há diferença na composição desta matriz entre esses tipos celulares e o significado biológico desse evento é um capítulo da biologia do *T. gondii* que merece ser investigado.

O desenvolvimento intracelular do *T. gondii* em astrócitos monitorado por análise ultraestrutural demonstrou que independente do estágio do desenvolvimento na célula hospedeira, contendo um ou vários parasitos, ou mesmo cistos, ocorre uma íntima interação da mitocôndria, RER e CL com o vacúolo albergando taquizoítos em divisão celular, formas em transição taquizoítos-bradizoítos e com a parede de cistos. Estas associações ocorrem

rapidamente após a invasão do parasito (Sinai, 2008; Gomes *et al.*, 2014; Nolan *et al.*, 2015), se mantendo durante todo o curso da infecção e tem sido observado em alguns modelos celulares utilizando como infecção primária taquizoítos de cepas do tipo I, de alta virulência e não cistogênicas e bradizoítos e taquizoítos de cepas do tipo II, avirulentas (Jones e Hirsch, 1972; Sinai *et al.*, 1997; Sinai e Joiner, 2001; Andrade *et al.*, 2001; Magno *et al.*, 2005b; Guimarães *et al.*, 2008; 2009; Gomes *et al.*, 2014; de Oliveira, 2014; Garcia, 2016).

A alta incidência de cistogênese, especificamente em certos tipos celulares, sugere que determinados microambientes apresentem características bioquímicas que favoreçam a persistência do parasitismo no hospedeiro. Mais recentemente, tem sido proposto que esta predileção seria por células diferenciadas, justificando a seleção pelo parasito por células musculares esqueléticas e neurônios para a manutenção do parasitismo no hospedeiro (Swierzy e Lüder, 2015). Esta hipótese testada, não explica a eficiência da conversão de taquizoítos em bradizoítos em algumas linhagens de células epiteliais renais, como células Vero e 293T fibroblastos, que são células tumorais com alta capacidade proliferativa, mostrando alto potencial de cistogênese, frente a diferentes formas infectantes e cepas de diversificado perfil genético de *T. gondii* (Weilhammer *et al.*, 2012; Paredes-Santos *et al.*, 2013; de Muno *et al.*, 2014, 2015; Garcia, 2016). Este conjunto de dados corrobora a hipótese de que o tipo celular associado ao estado metabólico das células seja decisivo para o sucesso da manutenção do parasito no organismo infectado. Todos esses parâmetros reforçam a necessidade da elucidação desse processo com estudos mais direcionados para os eventos que ocorrem *in vivo*, explorando os aspectos inerentes a cada tipo celular envolvido na cistogênese.

Colocando em foco, particularmente o desenvolvimento da cistogênese e a participação de organelas de astrócitos durante este processo, aqui mostramos detalhes dessa associação com cistos. As imagens inéditas com astrócitos, da movimentação direcionada das mitocôndrias e RER para os cistos, obtidas são bastante contundentes sugerindo uma resposta celular à invasão e à manutenção do *T. gondii* intracelular, tanto no estágio de multiplicação celular (taquizoíto e bradizoíto) quanto em cistos já estabelecidos. Este tópico tem sido bem caracterizado com taquizoítos e bradizoítos (Jones *et al.*, 1972; Sinai *et al.*, 1997; Sinai e Joiner, 2001; Magno *et al.*, 2005b; Gomes *et al.*, 2014, de Oliveira, 2014) mas, ainda permanece um assunto muito pouco explorado em se tratando do estabelecimento da cistogênese nas células hospedeiras (Sahm *et al.*, 1997; Sims *et al.*, 1989a; Lindsay *et al.*,

1998; Garcia, 2016). O favorecimento da circulação de nutrientes para os parasitos intracísticos (bradizoítos), garantindo sua sobrevivência por longos períodos no hospedeiro é uma das hipóteses possíveis. Então, além da manipulação da célula hospedeira, como uma das estratégias do estabelecimento da cistogênese, o *T. gondii* mantém a célula viável por longos períodos, a partir da modulação negativa da apoptose (Laliberté e Carruthers, 2008), aumentando a expressão de proteínas antiapoptóticas, ativando as vias de sinalização de sobrevivência da célula e inibindo produção de proteínas proapoptóticas (Payne *et al.*, 2003; Molestina *et al.*, 2003; Kim e Denkers, 2006; Carmen e Sinai, 2011).

Um aspecto morfológico que nos tem chamado a atenção durante as análises ultraestruturais é a presença constante de células contendo múltiplos vacúolos, com um a dois parasitos (bradizoítos/taquizoítos), em estreito contato entre suas membranas, com e sem mediação do RER, sugestivas de fusão ou perda da integridade dessas membranas. Esta observação não é restrita aos astrócitos, tendo em vista que em células musculares, de Oliveira (2014) já descrevia esse evento. No presente trabalho, nós não fomos capazes de garantir a ocorrência de comunicação entre esses vacúolos, sendo necessário um estudo sistemático de análise de cortes ultrafinos seriados para validar ou não essa hipótese. Não excluimos a possibilidade de que essa “fragilidade das membranas” entre os vacúolos possa ser em decorrência do avanço do processo do ciclo lítico para a liberação dos parasitos intracelulares. Alguns estudos mostram que, durante o egresso de taquizoítos, existem alguns fatores que disparam os mecanismos de sinalização para o rompimento das membranas (vacuolar e plasmática), permitindo a evasão do parasito da célula hospedeira. Um desses fatores mais bem caracterizados é o cálcio, que a depender da sua concentração intracelular no parasito e na célula hospedeira, modula os mecanismos que promovem o egresso dos taquizoítos durante seu ciclo lítico (Blackman e Carruthers, 2013). Com base em vários estudos que relacionam a sinalização de cálcio entre RE e mitocôndria, podemos sugerir que a associação do RER com a MVP possa fornecer cálcio estocado em suas cisternas como estratégia de sobrevivência e egresso do *T. gondii*. Esta proposta é sustentada pela patente participação do cálcio no disparo da via intrínseca de apoptose, a qual passa pela liberação de citocromo c mitocondrial (Hajnoczky *et al.*, 2003, 2006; Breckenridge *et al.*, 2003; Spät *et al.*, 2008; Santo-Domingo e Demaurex, 2010; Parys, 2014; Marchi *et al.*, 2017).

Astrócitos infectados com taquizoítos e analisados após 8 dias de infecção mostraram vacúolos parasitóforos contendo parasitos em avançado estado de degradação, mantendo a

associação de mitocôndria e RER. Esses achados não foram observados por Jones e Hirsch (1972), Joiner *et al.* (1990) e Morisaki *et al.* (1995), quando ofereceram parasitos mortos por fixação ou opsonizados. Por outro lado, quando Sinai *et al.* (1997) trataram culturas infectadas com doses microbicidas de pirimetamina, provocaram a morte dos parasitos que haviam invadido as células ativamente, ou mesmo quando usaram inibidores de potencial de membrana mitocondrial (NaN_3 e CCCP), observaram o mesmo fenômeno de manutenção da associação MVP-organelas. Considerando-se que a entrada de parasitos por fagocitose não envolve a secreção de proteínas das róprias e inserção de suas proteínas na MVP, nossa tendência é concordar com as sugestões de Sinai *et al.* (1997) de que quando o parasito invade a célula por penetração ativa, não é necessário um “turnover” dos “receptores” do parasito para sustentar estas associações de organelas à MVP.

Então este conjunto de dados nos permite concluir que a resposta celular durante a infecção pelo *T. gondii* sugere a dependência do parasito pelo metabolismo da célula hospedeira, em particular de astrócitos, como descrito aqui, frente a maior ou menor atividade nos diferentes tipos celulares, o que garante o desenvolvimento intracelular do parasito (Jones *et al.*, 1972; Sinai *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2014). Além disso, apostam a contribuição do hospedeiro para o estabelecimento da fase crônica da toxoplasmose (Sinai e Joiner, 1997, 2001, 2002; Hill e Dubey, 2002; de Oliveira, 2014; Garcia, 2016). Há fortes evidências de que a célula hospedeira forneça lipídios e produtos do metabolismo intermediário para os parasitos intracelulares para sustentar, tanto a construção, quanto a manutenção perene da fase crônica da toxoplasmose (Sinai *et al.*, 1997; Sinai e Joiner, 2001; Coppens *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2014).

Na presente dissertação, além dos aspectos de infectividade de astrócitos frente ao *T. gondii* e a análise ultraestrutural desta interação, foi demonstrada a participação de organelas durante essa interação. Reservamos esse espaço agora para discutir o envolvimento de CL da célula hospedeira na manutenção do VP e de cistos teciduais. Uma das áreas mais excitantes da biologia celular durante a última década tem sido o estudo dos CL que permitem às células armazenarem moléculas não polares: tais como lipídios neutros em compartimentos específicos onde são sequestrados do ambiente celular e podem se acessados por mecanismos regulatórios. Sem dúvida, a atenção dada a estas organelas é devido ao seu papel central em várias patologias, incluindo as infecciosas (Bozza *et al.*, 2009, 2011; Melo e Dvorak, 2012; Gomes *et al.*, 2014; Meyers *et al.*, 2017).

É conhecido que o *T. gondii* mobiliza fontes de lipídios da célula hospedeira durante a sua invasão e seu ciclo intracelular (Charon e Sibley, 2002), e que o parasito não sintetiza seu próprio colesterol, obtendo-o da célula hospedeira (Coppens *et al.*, 2000; Portugal *et al.*, 2008). Além do RER e mitocôndrias, descrito desde os primeiros estudos da interação *T. gondii*-célula hospedeira por Jones *et al.* (1972), a participação de CL tem sido apontada neste sistema. Alterações no metabolismo lipídico e aumento do número de CL têm sido associadas com doenças inflamatórias causadas por agentes inflamatórios, como bactérias (D'Avila *et al.*, 2006; Mattos *et al.*, 2010), fungos (Sorgi *et al.*, 2009) e infecções por protozoários como *Leishmania amazonensis* (Pinheiro *et al.*, 2009), *Trypanosoma cruzi* (D'Avila *et al.*, 2011) e *T. gondii* (Charron e Sibley, 2002; Melo *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2014; Motta *et al.*, 2014; Oliveira, 2014; Nolan *et al.*, 2015).

Aqui, descrevemos, pela primeira vez, a associação de CL aos VP e aos cistos intracelulares durante a interação de *T. gondii*, com cepa ME-49 em astrócitos. Nosso pioneirismo se destaca devido o emprego da cepa avirulenta ME-49, tendo em vista que a maioria dos artigos que trata desse tema concentra a atenção na resposta celular frente à cepa RH, altamente virulenta (Charron e Sibley, 2002; Melo *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2014; Motta *et al.*, 2014; Nolan *et al.*, 2015) e o modelo celular astrócitos, ainda não explorado nestas abordagens. Em um estudo mais recente, Oliveira (2014) foi o primeiro autor demonstrando que cepas polares (RH e ME-49) induziam a formação de CL diferencialmente: ME-49 mais indutora em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas.

Outro aspecto inovador desta dissertação foi o estudo direcionado para o desenvolvimento da cistogênese com foco na resposta celular de astrócitos. Nossos resultados demonstraram a manutenção da associação de CL durante o ciclo lítico e a cistogênese, tanto a associação com o VP contendo taquizoítos quanto à parede de cistos. Observou-se que durante a associação de CL de astrócitos ao VP e com os cistos intracelulares, não houve exclusão da associação com mitocôndrias ou retículo endoplasmático. Por análise ultraestrutural foi visto CL em contato direto com a membrana do VP e dentro da matriz vacuolar, em torno e interagindo diretamente com a membrana do parasito e por vezes interligando mais de um vacúolo. Contato íntimo dos CL com a parede cística foram observados indicando que essas organelas são recrutadas e liberam seu conteúdo para dentro do PV e, possivelmente, fornecem lipídios para os bradizoítos intracísticos. Temos demonstrado que em células musculares esqueléticas, além do recrutamento de organelas para

o VP, ocorre um aumento no número e volume dos CL acompanhado pelo aumento da expressão da COX-2 e PGE₂, e sugerimos que este processo possa estar contribuindo para o controle da síntese da IL-12 e do IFN- γ frente infecção por *T. gondii* (Gomes *et al.*, 2014). Experimentos desenvolvidos pelo grupo de DaMatta (Mota *et al.*, 2014) mostraram também um aumento no número de CL, acompanhado do aumento da produção de PGE₂ com concomitante redução da produção de NO, tornando os macrófagos menos microbicidas. Assim, a associação direta de CL com VP sugere que *T. gondii* possa tirar vantagem como uma fonte de energia extra e favorecer a sua sobrevivência e crescimento intracelular.

A formação de CL induzida por infecção por patógenos foi proposta como parte do mecanismo de evasão do parasito (Bozza *et al.*, 2007; Melo & Dvorak, 2012). Esta hipótese é bem fundamentada e deve ser investigada em diferentes modelos celulares, explorando essa interação durante a cistogênese do *T. gondii*, como uma ferramenta para o bloqueio do avanço da fase crônica da toxoplasmose.

Romano *et al.* (2013) demonstraram que o VP se localiza preferencialmente perto do Golgi da célula hospedeira durante a infecção e permanece estreitamente associado à esta organela ao longo do desenvolvimento do ciclo lítico. O parasito fragmenta o Golgi em numerosas pequenas vesículas que rodeiam o VP, e as sequestra para dentro do VP. Uma vez marcadas com anticorpo contra Rab14, Rab30 ou Rab43, se colocalizam com esfingolípídeos derivados do hospedeiro no espaço vacuolar. Os autores acreditam que os esfingolípídeos eliminados contribuam para a replicação do parasito, pois qualquer alteração no seu metabolismo é prejudicial para o seu crescimento do *T. gondii*. Num estudo mais recente, Nolan *et al.* (2015) compararam *Neospora* e *Toxoplasma*, dois parasitos coccídeos do filo Apicomplexa, quanto a capacidade de interagirem com Golgi da célula hospedeira. Foi observado que *Neospora* não é capaz de desmontar o Golgi, não usando essa via para captação de lipídios e que esta diferença deve refletir divergências nas vias evolucionárias desses parasitos parentes. No nosso sistema, não fomos capazes de observar esta interação, e poderá ser uma abordagem no futuro para o melhor entendimento da biologia do *T. gondii*, com especial atenção às células de eleição da cistogênese, *in vivo* e *in vitro*.

Para avaliar os filamentos intermediários em astrócitos selecionamos a proteína GFAP, o componente mais diversificado e abundante de seu citoesqueleto. Os filamentos gliais são específicos de astrócitos e nossos resultados apontam diferentes perfis de distribuição destes filamentos durante o estabelecimento da cistogênese de *T. gondii*.

Observamos alterações no arranjo dos filamentos de GFAP quando VP continham taquizoítos, confirmando os dados de Halonen *et al* (1998). Identificamos, no entanto, o remodelamento dos filamentos de GFAP ao redor de VP em transição e cistos, e relacionamos o aumento da intensidade da marcação da GFAP, ao curso temporal da cistogênese. Nossos resultados estão de acordo com o único relato da avaliação dos filamentos intermediários em cistos de *T. gondii* encontrados em astrócitos (Halonen *et al.* 1998), os quais descreveram o acúmulo de filamentos gliais em torno dos cistos. Apresentamos dados contundentes do remodelamento dos filamentos de GFAP ao redor de VP em transição e de cistos, e sugerimos que este rearranjo esteja envolvido na estabilização física destas estruturas. Uma das alternativas para testar essa hipótese seria o pré-tratamento de células antes e durante a cistogênese por meio de compostos que desestabilizem esses filamentos.

Os resultados apresentados aqui, aliados aos estudos de outros autores em diferentes tipos celulares, revelam o quão dinâmico é o processo de estabelecimento da infecção pelo *T. gondii* e da formação de cistos teciduais em astrócitos. Com relação à estruturação da célula hospedeira para a sustentabilidade dos parasitos, estudos do nosso grupo têm mostrado um rearranjo de diferentes elementos do citoesqueleto em células musculares esqueléticas e células epiteliais (Gomes, 2011; Garcia, 2014). É necessário investigar se as alterações aqui descritas de GFAP, uma das proteínas da maquinaria estrutural de astrócitos, é consequência da presença do parasito induzindo alterações conformacionais dessas proteínas ou das estruturas formadas por elas. Nossa hipótese é que este remodelamento visa suportar fisicamente e metabolicamente a presença do cisto tecidual, estrutura que irá perdurar por longos períodos no interior da célula hospedeira.

Acreditamos que o *Toxoplasma* evoluiu de maneira a explorar moléculas e a própria resposta celular do hospedeiro, proporcionando assim, um ambiente favorável para o estabelecimento da fase crônica da infecção. Esse conjunto de dados reforça a ideia de que o recrutamento de organelas da célula hospedeira é uma importante fonte de lipídios e de outros produtos do metabolismo intermediário para o desenvolvimento e sustentação do parasito, quer durante o ciclo lítico (Sinai *et al.*, 1997; Sinai e Joiner, 2001; Coppens *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2014; Mota *et al.*, 2014) quer durante a cistogênese (Garcia (2016).

VII. CONCLUSÕES

(i) Astrócitos são susceptíveis à infecção pelo *T. gondii* e sustentam a replicação dos parasitos, a conversão taquizoíto-bradizoíto e a formação de cistos, indicativo de que são células importantes no contexto da toxoplasmose encefálica;

(ii) As evidências ultraestruturais da associação direta entre mitocôndrias e a MVP e cistos, do RER com a face lisa voltada para a MVP e a parede cística, algumas vezes mediada por mitocôndrias mostra a influência do parasitismo na maquinaria de astrócitos induzindo ao recrutamento e remodelamento dessas organelas durante o ciclo lítico e a cistogênese do *T. gondii*;

(iii) A migração e a interação de mitocôndrias, RE e CL com VP contendo taquizoítos, VP com formas em transição taquizoítos-bradizoítos e a parede cística de *T. gondii* em astrócitos é constante e permanente, o que deve contribuir e garantir o sucesso da manutenção do parasitismo por meio do trânsito de moléculas entre o ambiente vacuolar/cisto e o citoplasma da célula hospedeira;

(iv) Este conjunto de dados abre perspectivas para o aprofundamento da interação *T. gondii*-astrócitos, explorando se a infecção induz o aumento da biogênese de CL, interferindo na síntese de citocinas, ou ainda se a inibição da síntese de CL tem efeito no destino intracelular do parasito, em particular no estabelecimento da cistogênese. Essas abordagens poderão contribuir para um melhor entendimento da relação harmônica estabelecida pelo *T. gondii* para garantir a sua permanência por longos períodos no hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- Akins CK, Panicker S, Cunningham CL. 2004. *Laboratory Animals in Research and Teaching: Ethics, Care, and Methods*. APA Press.
- Ajzenberg D. 2010. Type I strains in human toxoplasmosis: myth or reality? *Future Microbiol.* 5(6): 841-3.
- Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. 2005. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. *Plos Pathog.* 1(2): e17.
- Andrade EF, Stumbo AC, Monteiro-Leal LH, Carvalho L, Barbosa HS. 2001. Do microtubules around the *Toxoplasma gondii*-containing parasitophorous vacuole in skeletal muscle cells form a barrier for the phagolysosomal fusion? *J Submicrosc Cytol Pathol.* 33: 337-341.
- Barbosa HS, Ferreira-Silva MF, Guimarães EV, Carvalho L, Rodrigues RM. 2005. Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear localization. *Journal of Parasitology.* 91(1): 182-184.
- Bartz R, Li WH, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, *et al.* 2007. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J. Lipid Res.* 48: 837-47.
- Basavaraju A. 2016. Toxoplasmosis in HIV infection: An overview. *Trop Parasitol.* 6(2): 129-135.
- Beckers CJ, Wakefield T, Joiner KA. 1997. The expression of *Toxoplasma* proteins in *Neospora caninum* and the identification of a gene encoding a novel rhoptry protein. *Mol Biochem Parasitol.* 89(2): 209-23.
- Behnke MS, Radke JB, Smith AT, Sullivan WJ Jr, White MW. 2008. The transcription of bradyzoite genes in *Toxoplasma gondii* is controlled by autonomous promoter elements. *Mol Microbiol.* 68(6): 1502-18.
- Besteiro S, Dubremetz JF, Lebrun M. 2011. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell Microbiol.* 13(6): 797-805.
- Blackman MJ, Carruthers VB. 2013. Recent insights into apicomplexan parasite egress provide new views to a kill. *Curr Opin Microbiol.* 16(4): 459-64.
- Blader IJ, Saeji JP. 2009. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development immune evasion, and virulence. *APMIS.* 117(5-6): 458-76.
- Blanchard N, Dunay IR, Schlüter D. 2015. Persistence of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system: a fine-tuned balance between the parasite, the brain and the immune system. *Parasite Immunol.* 37: 150-158.
- Bohne W, Heesemann J, Gross U. 1993. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect Immun.* 61(3): 1141-5.

- Bohne W, Heesemann J, Gross U. 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): 1761-7.
- Bohne W, Holpert M, Gross U. 1999. Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology.* 201(2): 248-54.
- Boothroyd JC, Dubremetz JF. 2008. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol.* 6(1): 79-88.
- Bozza PT, Melo RCN, Bandeira-Melo C. 2007. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther.* 113: 30–49.
- Bozza PT, D Avila H, Almeida, Almeida PE, Magalhães KG ; Molinaro R ; Almeida CJ, Maya-Monteiro CM. 2009. Lipid droplets in host pathogen interactions. *Clinical Lipidology (Print).* 4: 791-807.
- Bozza PT, Bakker-Abreu I, Navarro-Xavier RA, Bandeira-Melo C. 2011. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 85: 205–213.
- Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC. 2003. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol.* 160(7): 1115-27.
- Brossier F, Jewett TJ, Sibley LD, Urban S. 2005. A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(11): 4146-51.
- Burda JE, Sofroniew MV. 2014. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron.* 81(2): 229-48.
- Bushong, EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci.* 22: 183–192.
- Cabral CM, Tuladhar S, Dietrich HK, Nguyen E, MacDonald WR, Trivedi T, Devineni A, Koshy AA. 2016. Neurons are the primary target cell for the brain-tropic intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Plos Pathogens.* 12(2). e1005447.
- Caffaro CE, Boothroyd JC. 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.
- Caldas LA, Attias M, de Souza W. 2009. Dynamin inhibitor impairs *Toxoplasma gondii* invasion. *FEMS Microbiol Lett.* 301(1): 103-8.
- Caldas LA, de Souza W, Attias M. 2010. Microscopic analysis of calcium ionophore activated egress of *Toxoplasma gondii* from the host cell. *Vet Parasitol.* 167(1): 8-18.
- Carmen JC, Sinai AP. 2011. The differential effect of *Toxoplasma gondii* infection on the stability of BCL2-family members involves multiple activities. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2011.00001.
- Cesbron-Delauw MF. 1994. Dense granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today.* 10: 293–296.

- Chai Z, Sarcevic B, Mawson A, Toh BH. 2001. SET-related cell division autoantigen-1 (CDA1) arrests cell growth. *J Biol Chem.* 276: 33665–33674.
- Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ. 1991. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron.* 6: 983–992.
- Charron AJ, Sibley LD. 2002. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 115(Pt 15): 3049–59.
- Contreras-Ochoa CO, Lagunas-Martínez A, Belkind-Gerson J, Correa D. 2012. *Toxoplasma gondii* invasion and replication in astrocyte primary cultures and astrocytoma cell lines: systematic review of the literature. *Parasitol Res.* 110: 2089-2094.
- Coppens I, Sinai AP, Joiner KA. 2000. *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J Cell Biol.* 149(1): 167–180.
- Coppens I. 2006. Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis. *Cell Microbiol.* 8(1): 1-9.
- Creuzet C, Robert F, Roisin MP, Van Tan H, Benes C, Dupouy-Camet J, Fagard R. 1998. Neurons in primary culture are less efficiently infected by *Toxoplasma gondii* than glial cells. *Parasitol Res.* 84: 25-30.
- Daubener W, Remscheid C, Nockemann S, Pilz K, Seghrouchni S, Mackenzie C, Hadding U. 1996. Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol.* 26: 487–492.
- D'Avila H, Melo RCN, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. 2006. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of LBs: intracellular domains for eicosanoid synthesis *in vivo*. *J Immunol* 176: 3087-3097.
- D'Avila H, Freire-de-Lima CG, Roque NR, Teixeira L, Barja-Fidalgo C, Silva AR, Melo RC, Dosreis GA, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. 2011. Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E₂ generation and increased parasite growth. *J Infect Dis.* 204(6): 951-61.
- Deckert-Schluter M, Buck C, Schlüter D. 1999. Kinetics and differential expression of heat-stable antigen and GL7 in the normal and *Toxoplasma gondii*-infected murine brain. *Acta Neuropathol. (Berl)* 98: 97–106.
- DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano JI. 2002 Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *J Neurocytol.* 31: 299–316.
- de Melo EJT, Carvalho TU, de Souza W. 1992. Penetration of *Toxoplasma gondii* into host cells induces changes in the distribution of mitochondria and the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct.* 17: 311–317.
- de Melo EJT, de Souza W. 1997. A cytochemistry study of the inner membrane complex of the pellicle of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* 83: 252-256
- de Muno RM, Moura MA, de Carvalho LC, Seabra SH, Barbosa HS. 2014. Spontaneous

cystogenesis of *Toxoplasma gondii* in feline epithelial cells *in vitro*. *Folia Parasitol.* 61(2): 113-9.

Desmonts G, Couvreur J. 1974. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N Engl J Med.* 290(20): 1110-6.

de Oliveira HC. Envolvimento de mitocôndrias e do retículo endoplasmático da célula muscular esquelética na cistogênese de *Toxoplasma gondii*. 2014. 96f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

de Souza W, Martins-Duarte ES, Lemgruber L, Attias M, Vommaro RC. 2010. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. *Sci Med Porto Alegre.* 20(1): 131-143.

Di Cristina M, Marocco D, Galizi R, Proietti C, Spaccapelo R, Crisanti A. 2008. Temporal and spatial distribution of *Toxoplasma gondii* differentiation into bradyzoites and tissue cyst formation *in vivo*. *Infect Immun.* 76(8): 3491-501.

Drögemüller K, Helmuth U, Brunn A, M Sakowicz-Burkiewicz M, David H, Gutmann DH, Mueller W, Deckert M, Schlüter D. 2016. Astrocyte gp130 Expression Is Critical for the Control of *Toxoplasma* Encephalitis. *J Immunol.* 181(4): 2683-93.

Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. 1970. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med.* 132: 636-662.

Dubey JP, Frenkel JK. 1976. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool.* 23: 537-546.

Dubey JP. 1986. Toxoplasmosis in cats. *Feline Pract.* 16: 12-45.

Dubey JP. 1997. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol.* 44(6): 592-602.

Dubey, JP, Speer CA, Shen SK, Kwok OC, Blixt JA. 1997. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol.* 83: 870-882.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology Reviews.* 11(2): 267-299.

Dubey JP, Velmurugan GV, Chockalingam A, Pena HFJ, de Oliveira LN, Leifer CA, Gennari SM, Bahia Oliveira LM, Su C. 2008. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet Parasitol.* 157(3-4): 299-305.

Dubey JP. 2010. Toxoplasmosis of animals and humans. 2^a ed. Boca Raton: CRC Press.

Dumètre A, Dubey JP, Ferguson DJ, Bongrand D, Azas N, Puech PH. 2013. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. *Proc. Natl Acad Sci. USA.* 110: 11535-11540.

Dzierszinski F, Nishi M, Ouko L, Roos DS. 2004. Dynamics of *Toxoplasma gondii*

differentiation. *Eukaryot Cell*. 3(4): 992-1003.

El Hajj H, Demey E, Poncet J, Lebrun M, Wu B, Galéotti N, Fourmaux MN, Mercereau-Puijalon O, Vial H, Labesse G, Dubremetz JF. 2006. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: proteomic and genomic characterization and molecular modeling. *Proteomics*. 6(21): 5773-84.

El Hajj H, Lebrun M, Arold ST, Vial H, Labesse G, Dubremetz JF. 2007. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog*. 3(2): e14.

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem Res*. 25: 1439–1451.

Evans R. 1992. Life cycle and animal infection. In: Ho-Yen, DO.; Joss, AWL., editors. *Human toxoplasmosis*. Oxford: Oxford University Press. 26-55.

Fagard R, Van Tan H, Creuzet C, Pelloux H. 1999. Differential development of *Toxoplasma gondii* in neural cells. *Parasitology Today*. 15(12): 504-507.

Farese RV, Walther TC. 2016. Lipid droplets go nuclear. *J Cell Biol*. 212(1): 7-8.

Ferguson DJ, Birch-Andersen A, J. Siim J Chr, Hutchison WM. 1979. Ultrastructural Studies on the Sporulation of Oocysts of *Toxoplasma Gondii*. *APMIS*. 87B(1-6): 253-260.

Ferguson DJ, Hutchison WM. 1987a. 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 DJ, Hutchison WM. 1987b. 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.

Ferguson DJ, Hutchison WM, Pettersen E. 1989. Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. An immunocytochemical and ultrastructural study. *Parasitol Res*. 75: 599–603.

Ferreira-da-Silva M da F, Barbosa HS, Gross U, Lüder CG. 2008. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biosyst*. 4(8): 824-34.

Ferreira-da-Silva M da F, Takács AC, Barbosa HS, Gross U, Lüder CG. 2009a. Primary skeletal muscle cells trigger spontaneous *Toxoplasma gondii* tachyzoite-to-bradyzoite conversion at higher rates than fibroblasts. *Int J Med Microbiol*. 299(5): 381-8.

Ferreira-da-Silva M da F, Rodrigues RM, Andrade EF, de Carvalho L, Gross U, Lüder CG *et al*. 2009b. Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104(2): 196-200.

Fields, RD, Stevens-Graham B. 2002. New insights into neuron-glia communication. *Science*. 298: 556–562.

- Fischer HG, Nitzgen B, Reichmann G, Gross U, Hadding U. 1997(a). Host cells of *Toxoplasma gondii* encystation in infected primary culture from mouse brain. *Parasitol Res.* 83(7): 637–641.
- Fischer HG, Nitzgen B, Reichmann G, Hadding U. 1997(b). Cytokine responses induced by *Toxoplasma gondii* in astrocytes and microglial cells. *Eur J Immunol.* 27(6): 1539-1548.
- Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH. 2014. Toxoplasmosis – A Global Threat. Correlation of Latent Toxoplasmosis with Specific Disease Burden in a Set of 88 Countries. *Plos One.* 9(3): e90203.
- Fox BA, Gigley JP, Bzik DJ. 2004. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. *Int J Parasitol.* 34(3): 323-31.
- Francia ME, Striepen B. 2014. Cell division in apicomplexan parasites. *Nat Rev Microbiol.* 12(2): 125-36.
- Frazaõ-Teixeira E, Sundar N, Dubey JP, Grigg ME, de Oliveira FC. 2011. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. *Vet Parasitol.* 175(1-2): 33-9.
- Frenkel JK. 1973. Toxoplasmosis: parasite life cycle pathology and immunology. In: Hammond DM, Long PL, eds. *The Coccidia*. Baltimore: University Park Press. 343-410.
- Frenkel, JK, Ruiz A, Chinchilla M. 1975. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am J Trop Med. Hyg.* 24: 439–443.
- Frenkel JK. 1988. Pathophysiology of Toxoplasmosis. *Parasitology Today.* 4(10): 273-278.
- Freppel W, Puech PH, Ferguson DJ, Azas N, Dubey JP, Dumètre A. 2016. Macrophages facilitate the excystation and differentiation of *Toxoplasma gondii* sporozoites into tachyzoites following oocyst internalization. *Scientific Reports.* 6, 33654; doi: 10.1038/srep33654.
- Fujimoto T, Parton RG. 2011. Not Just Fat: The Structure and Function of the Lipid Droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a004838.
- Gao Q, Goodman JM. 2015. The lipid droplet—a well-connected organelle. *Front Cell Dev Biol.* 3: 49.
- Garcia MC. 2016. Avaliação estrutural de proteínas do citoesqueleto e de algumas de suas proteínas associadas em células musculares esqueléticas e epiteliais renais durante a cistogênese de *Toxoplasma gondii* [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.
- Garcia-Segura LM, Melcangi RC. 2006. Steroids and glial cell function. *Glia.* 54: 485–498.

- Goldszmid RS, Coppens I, Lev A, Caspar P, Mellman I, Sher A. 2009. Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells. *J Exp Med*. 206(2): 399-410.
- Gomes AF, Guimarães EV, Carvalho L, Correa JR, Mendonça-Lima L, Barbosa HS. 2011. *Toxoplasma gondii* down modulates cadherin expression in skeletal muscle cells inhibiting myogenesis. *BMC Microbiol*. 11: 110. doi: 10.1186/1471-2180-11-110.
- Gomes AF, Magalhaes KG, Rodrigues RM, de Carvalho L, Molinaro R, Bozza PT, Barbosa HS. 2014. *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN-g and PGE2. *Parasit Vectors*. 7:47.10.1186/1756-3305-7-47.
- Gordon GR, Mulligan SJ, MacVicar BA. 2007. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia*. 55: 1214–1221.
- Gregorios JB, Mozes LW, Norenberg MD. 1985. Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures. II. Electron microscopic studies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 44(4): 404-14.
- Grimwood J, Mineo JR, Kasper LH. 1996. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent. *Infection and Immunity*. 64(10): 4099–4104.
- Gross U, Bohne W, Lüder CGK, Lugert R, Seeber F, Dittrich C, Pohl F, Ferguson DJP. 1996. Regulation of developmental differentiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol*. 43: 114S-116S.
- Gross U, Kempf MC, Seeber F, Lüder CG, Lugert R, Bohne W. 1997. Reactivation of chronic toxoplasmosis: is there a link to strain-specific differences in the parasite? *Behring Inst Mitt*. 99: 97-106.
- Guimarães EV, de Carvalho L, Barbosa HS. 2008. Primary Culture of Skeletal Muscle Cells as a Model for Studies of *Toxoplasma gondii* Cystogenesis. *Journal of Parasitology*. 94(1): 72-83.
- Guimarães EV, de Carvalho L, Barbosa HS. 2009. Interaction and cystogenesis of *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells *in vitro*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104(2): 170-4.
- Hajnóczky G, Erika Davies E, Madesh M. 2003. Calcium signaling and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 304: 445–454
- Hajnóczky G, Csordás G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Roy SS, Yi M. 2006. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium*. 40(5-6): 553–560.
- Halonen SK, Lyman WD, Chiu FC. 1996. Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neurons and astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol*. 55(11): 1150–1156.
- Halonen SK, Weiss LM, Chiu FC. 1998. Association of host cell intermediate filaments with *Toxoplasma gondii* cysts in murine astrocytes *in vitro*. *Int J Parasitol*. 28(5): 815-23.
- Halonen SK, Weiss LM. 2013. Toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol*. 114: 125–145.

- Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Health Research Reviews*. 6(1): 41-46.
- Hol EM, Pekny M. 2015. *Current Opinion in Cell Biology*. 32: 121-130.
- Hostenbach S, Cambron M, D'haeseleer M, Kooijman R, De Keyser J. 2014. Astrocyte loss and astrogliosis in neuroinflammatory disorders. *Neurosci Lett*. 565: 39-41.
- Howe DK, Sibley LD. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*. 172: 1561–1566.
- Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 35: 1411–1414.
- Ho-Yen DO. 1992. Immunocompromised patients. In *Human Toxoplasmosis*. 1 ed. Oxford: Oxford University Press. 184-203.
- Iadecola C, Nedergaard M. 2007. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*. 10: 1369–1376.
- Jackson MH, Hutchison WM. 1989. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv Parasitol*. 28:55–105.
- Joiner KA, Furhman SA, Miettinen HM, Kasper LH, Mellman T. 1990. *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuole in Fc-receptor transfected fibroblasts. *Science*. 249: 641-646.
- Jones TC, Hirsch J. 1972. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells – The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. *The Journal of Experimental Medicine*. 136(5): 1157-72.
- Jones TC, Bienz KA, Erb P. 1986. *In vitro* cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. *Infection and Immunity*. 51(1): 147-156.
- Kafsack BF, Pena JD, Coppens I, Ravindran S, Boothroyd JC, Carruthers VB. 2009. Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *PLoS Pathog*. 5(12): e137-3.
- Kalantari F, Bergeron JJM, Nilsson T. 2010. Biogenesis of lipid droplets – how cells get fatter. *Molecular Membrane Biology*. 27(8): 462-468.
- Kalscheuer R, Steinbuchel A. 2003. A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. *J Biol Chem*. 278: 8075–82.
- Khakh BS, Sofroniew MV. 2015. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature Neuroscience*. 18(7): 942-952.
- Kim L, Denkers EY. 2006. *Toxoplasma gondii* triggers Gi-dependent PI 3-kinase signaling required for inhibition of host cell apoptosis. *J. Cell Sci*. 119: 2119–26.

- Kimelberg HK, Nedergaard M. 2010. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics*. 7(4): 338-353.
- Kiray H, Lindsay SL, Hosseinzadeh S, Barnett SC. 2016. The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination. *Experimental Neurology*. 283: 541-549.
- Kirchhausen T, Macia E, Pelish, HE. 2008. Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Method Enzymol*. 438: 77-93.
- Knoll LJ, Tomita T, Weiss LM. 2014. Bradyzoite Development. In: Weiss LM, Kim K, editors. *Toxoplasma gondii* The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods. New York: Academic Press. 2 ed. 521–551.
- Ko RC, Wong FW, Todd D, Lam KC. 1980. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in the Chinese population of Hong Kong. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 74: 351–4.
- Labesse G, Gelin M, Bessin Y, Lebrun M, Papoin J, Cerdan R, Arold ST, Dubremetz JF. 2009. ROP2 from *Toxoplasma gondii*: a virulence factor with a protein-kinase fold and no enzymatic activity. *Structure*. 17(1): 139-46.
- Laliberté J, Carruthers VB. 2008. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci*. 65(12): 1900-15.
- Leber R, Zinser E, Zellnig G, Paltauf F, Daum G. 1994. Characterization of lipid particles of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 10: 1421–28.
- Lecoeur H, Giraud E, Prevost MC, Milon G, Lang T. 2013. Reprogramming neutral lipid metabolism in mouse dendritic leucocytes hosting live *Leishmania amazonensis* amastigotes. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(6): e2276.10.1371.
- Lemgruber L, De Souza W, Vommaro RC. 2008. Freeze-fracture study of the dynamics of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole development. *Micron*. 39: 177-83.
- Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC, Nodin C, Stahlberg A, Aprico K, Larsson K *et al*. 2008. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 28: 468-481.
- Lindsay DS, Dubey JP, Blagburn BL, Toivio-Kinnucan M. 1991. Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradyzoites, tachyzoites, and sporozoites. *J Parasitol*. 77: 126-132.
- Lindsay DS, Toivio-Kinnucan MA, Blagburn BL. 1993. Ultrastructural determination of cystogenesis by various *Toxoplasma gondii* isolates in cell culture. *J Parasitol*. 79: 289-292.
- Lindsay DS, Toivio-Kinnucan MA, Blagburn BL. 1998. Decoquinate induces tissue cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol* 15: 75-81.
- Listenberger LL, Han XL, Lewis SE, Cases S, Farese RV *et al*. 2003. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3077–82.
- Lopes CS, Franco PS, Silva NM, Silva DA, Ferro EA, Pena HF, Soares RM, Gennari SM, Mineo JR. 2016. Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii*

- isolates in free-range chickens from Uberlândia, Brazil. *Epidemiol Infect.* 144(9): 1865-75.
- Lüder CG, Giraldo-Velásquez M, Sendtner M, Gross U. 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 BJ, Remington JS. 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis.* 15(2): 211-22.
- Magno RC, Straker LC, de Souza W, Attias M. 2005a. Interrelations between the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii* and host cell organelles. *Microsc Microanal.* 11: 166–174.
- Magno RC, Lemgruber L, Vommaro RC, De Souza W, Attias M. 2005b. Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc Res Tech.* 67(1): 45-52.
- Manger ID, Hehl A, Parmley S, Sibley LD, Marra M, Hillier L, Waterston R, Boothroyd JC. 1998. Expressed sequence tag analysis of the bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*: identification of developmentally regulated genes. *Infect Immun.* 66(4): 1632-7.
- Manthorpe M, Adler R, Varon S. 1979. Development, reactivity and GFA immunofluorescence of astroglia-containing monolayer cultures from rat cerebrum. *J Neurocytol.* 8: 605-621.
- McHugh TD, Gbewonyo A, Johnson JD, Holliman RE, Butcher PD. 1993. Development of an *in vitro* model of *Toxoplasma gondii* cyst formation. *FEMS Microbiol Lett.* 114: 325-332.
- Maragakis NJ, Rothstein JD. 2006. Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2(12): 679-89.
- Marchi S, Patergnani S, Missiroli S, Morciano G, Rimessi A, Wieckowski MR, Giorgi C, Pinton P. 2017. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium.* pii: S0143-4160(17)30062-3.
- Martin DL. 1992. Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia.* 5: 81-94.
- Martin S, Parton RG. 2006. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(5): 373-8.
- Masuda Y, Itabe H, Odaki M, Hama K, Fujimoto Y *et al.* 2006. ADRP/adipophilin is degraded through the proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells. *J Lipid Res.* 47: 87–98.
- Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VG, Sarno EN, Atella GC, Pereira GM, Bozza PT, Pessolani MC. 2010. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol.* 87: 371-384.
- Meester I, Rosas-Taraco AG, Solís-Soto JM, Salinas-Carmona MC. 2011. The roles of lipid droplets in human infectious disease. *Medicina Universitaria* 13(53): 207-216.

- Melo RCN, D'Avila H, Fabrino DL, Almeida PE, Bozza PT. 2003. Macrophage lipid body induction by Chagas disease *in vivo*: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell* 35: 59–67.
- Melo RCN, Fabrino DL, Dias FF, Parreira GG. 2006. Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. *Inflamm Res* 55: 342–348.
- Melo RCN, Dvorak AM. 2012. Lipid Body–Phagosome Interaction in Macrophages during Infectious Diseases: Host Defense or Pathogen Survival Strategy? *PLoS Pathog* 8(7): e1002729.
- Melzer TC, H. J. Cranston, L. M. Weiss, S. K. Halonen. 2010. Host Cell Preference of *Toxoplasma gondii* Cysts in Murine Brain: A Confocal Study. *J Neuroparasitology*.1. doi 10.4303/jnp/N100505.
- Mercier C, Dubremetz JF, Rauscher B, Lecordier L, Sibley LD, Cesbron-Delauw MF. 2002. Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol Biol Cell*. 13(7): 2397–2409.
- Meyers A, Chourey K, Weiskittel TM, Pfiffner S, Dunlap JR, Hettich RL, Dalhaimer P. 2017. The protein and neutral lipid composition of lipid droplets isolated from the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Microbiology*. 55(2): 112-122.
- Middeldorp J, Hol EM. 2011. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*. (3): 421-43.
- Molestina RE, Payne TM, Coppens I, Sinai AP. 2003. Activation of NF- κ B by *Toxoplasma gondii* correlates with increased expression of antiapoptotic genes and localization of phosphorylated I κ B to the parasitophorous vacuole membrane. *J. Cell Sci*. 116: 4359–71.
- Montoya JG, Liesenfeld O. 2004. Toxoplasmosis. *The Lancet*. 363: 1965-1976.
- Mordue DG, Sibley LD. 1997. Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J Immunol*. 159: 4452-4459.
- Mordue DG, Hakansson S, Niesman I, Sibley LD. 1999. *Toxoplasma gondii* resides in a vacuole that avoids fusion with host cell endocytic vesicular trafficking pathways. *Experimental Parasitology*. 92(2): 87-99.
- Mordue DG, Monroy F, La Regina M, Dinarello CA, Sibley LD. 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol*. 167(8): 4574–4584.
- Morisaki JH, Heuser JE, Sibley LD. 1995. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci*. 108 (Pt 6): 2457-64.
- Mota LAM, Neto JR, Monteiro VG, Lobato CSS, de Oliveira MA, da Cunha M, D'Ávila H, Seabra SH, Bozza PT, DaMatta RA. 2014. Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associate with the parasitophorous vacuole and decrease their microbicidal capacity against *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 109(6): 767–774.

- Moura M, Amendoeira MR, Barbosa HS. 2009. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104(6): 862-64.
- Murphy DJ. 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res*. 40: 325–438.
- Nagamune K, Hicks LM, Fux B, Brossier F, Chini EN, Sibley LD. 2008. Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. *Nature*. 451(7175): 207-10.
- Naguleswaran A, Elias EV, McClintick J, Edenberg HJ, Sullivan Jr WJ. 2010. *Toxoplasma gondii* Lysine Acetyltransferase GCN5-A Functions in the Cellular Response to Alkaline Stress and Expression of Cyst Genes. *Plos Pathogens*. 6(12): e1001232.
- Nakaar V, Ngô HM, Aaronson EP, Coppens I, Stedman TT, Joiner KA. 2003. Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*. 116(Pt 11): 2311-20.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. 2003. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences*. 26(10): 523-530.
- Nett WJ, Oloff SH, McCarthy KD. 2002. Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J Neurophysiol*. 87: 528–537.
- Nieweg K, Schaller H, Pfrieder FW. 2009. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem*. 109: 125-134.
- Nicolle C, Manceaux L. 1909. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Hebd Séances Acad Sci*. 148: 369 – 372.
- Nolan SJ, Romano JD, Luechtefeld T, Coppens I. 2015. *Neospora caninum* recruits host cell structures to its parasitophorous vacuole and salvages lipids from organelles. *Eukaryot Cell*. 14(5): 454-73.
- Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JH, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojemann JG, Ransom BR, Goldman SA, Nedergaard M. 2009. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci*. 29: 3276–3287.
- Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. 2012. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol*. 814: 23-45.
- Ogata K, Kosaka T. 2002. Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience*. 113: 221–233.
- Ohsaki Y, Kawai T, Yoshikawa TY, Cheng J, Jokitalo JE, Fujimoto T. 2016. PML isoform II plays a critical role in nuclear lipid droplet formation. *J. Cell Biol*. 212(1): 29-38.
- Ozeki S, Cheng JL, Tauchi-Sato K, Hatano N, Taniguchi H, Fujimoto T. 2005. Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J Cell Sci*. 118: 2601–11.

Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. 2002. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation *in vivo*: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol.* 169: 6498-6506.

Pappas G, Roussos N, Falagas ME. 2009. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol.* 39(12): 1385-94.

Paredes-Santos TC, de Souza W, Attias M. 2012. Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. *J Struct Biol.* 177(2): 420-30.

Parades-Santos TC, Martins-Duarte ES, Vitor RW, de Souza W, Attias M, Vommaro RC. 2013. Spontaneous cystogenesis *in vitro* of a Brazilian strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Int.* 62(2): 181-8.

Parys JB. 2014. The IP3 receptor as a hub for Bcl-2 family proteins in cell death control and beyond. *Sci Signal.* 7(312): pe4.

Payne TM, Molestina RE, Sinai AP. 2003. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF- κ B function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. *J Cell Sci.* 116: 4345–58.

Pekny M, Johansson CB, Eliasson C, Stakeberg J, Wallén A, Perlmann T, Lendahl U, Betsholtz C, Berthold CH, Frisén J. 1999. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J Cell Biol.* 145(3): 503-14.

Pekny M, Lane EB. 2007. Intermediate filaments and stress. *Exp Cell Res.* 313: 2244-2254.

Pekny M, Pekna M. 2014. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev.* 94: 1077-1098.

Pelloux H, Pernod G, Polack B, Coursange E, Ricard J, Verna JM, Ambroise-Thomas P. 1996. Influence of cytokines on *Toxoplasma gondii* growth in human astrocytoma-derived cells. *Parasitol Res.* 82(7): 598–603.

Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol.* 38(5): 561-569.

Peng HJ, Chen XG, Lindsay DS. 2011. A review: Competence, compromise, and concomitance-reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. *97(4):* 620-8.

Pereira KS, Franco RM, Leal DA. 2010. Transmission of Toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) by Foods. *Advances in food and nutrition research.* 60: 1–19.

Pernas L, Boothroyd JC. 2010. Association of host mitochondria with the parasitophorous vacuole during *Toxoplasma* infection is not dependent on rhoptyry proteins ROP2/8. *Int J Parasitol.* 40: 1367–1371.

- Pernas L, Adomako-Ankomah Y, Shastri AJ, Ewald SE, Treeck M *et al.* 2014. *Toxoplasma* effector MAF1 mediates recruitment of host mitochondria and impacts the host response. *PLoS Biol.* 12: e1001845.
- Peters A, Palay SL, Webster HD. 1991. *The fine structure of the nervous system.* 3 ed. Oxford University Press, New York.
- Peterson PK, Gekker G, Hu S, Chao CC. 1993. Intracellular survival and multiplication of *Toxoplasma gondii* in astrocytes. *J Infect Dis.* 168(6): 1472–1478.
- Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D’Avila H, Bozza PT, Takiya CM *et al.* 2009. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect.* 11(2): 181–90.
- Ploegh HL. 2007. A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature.* 448: 435-8.
- Pol A, Gross SP, Parton RG. 2014. Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. *J Cell Biol.* 204: 635–646.
- Portugal LR, Fernandes LR, Pietra Pedroso VS, Santiago HC, Gazzinelli RT, Alvarez-Leite JI. 2008. Influence of low-density lipoprotein (LDL) receptor on lipid composition, inflammation and parasitism during *Toxoplasma gondii* infection. *Microbes Infect.* 10(3): 276-84.
- Powell EM, Geller HM. 1999. Dissection of astrocyte mediated cues in neuronal guidance and process extension. *Glia.* 26: 73–83.
- Pulido-Méndez M, Finol HJ, Girón ME, Aguilar I. 2006. Ultrastructural pathological changes in mice kidney caused by *Plasmodium berghei* infection. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 38(2–3): 143–8.
- Rabhi S, Rabhi I, Trentin B, Piquemal D, Regnault B, Goyard S *et al.* 2016. Lipid droplet formation, their localization and dynamics during *Leishmania major* macrophage infection. *PLoS One.* 11(2): e0148640.10.1371.
- Radke JR, Behnke MS, Mackey AJ, Radke JB, Roos DS, White MW. 2005. The transcriptome of *Toxoplasma gondii*. *BMC Biol.* 3: 26.
- Radke JR, Donald RG, Eibs A, Jerome ME, Behnke MS, Liberator P, White MW. 2006. Changes in the expression of human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma gondii* growth and development. *PLoS Pathog.* 2(10): e105.
- Ramon Y, Cajal S. 1909. *Histologie du systeme nerveux del’homme et des vertebres.* Maloine, Paris.
- Reese ML, Boothroyd JC. 2009. A helical membrane-binding domain targets the *Toxoplasma* ROP2 family to the parasitophorous vacuole. *Traffic.* (10): 1458-70.
- Remington JS, Cavanaugh EN. 1965. Isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain. *N Engl J Med.* 273: 1308–1310.

- Remington JS. 1974. Toxoplasmosis in the adult. *Bull N Y Acad Med.* 50(2): 211–227.
- Remington JS, Desmonts G. 1990. Toxoplasmosis. In: Remington, JS.; Klein, JO., editors. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant.* 3. Philadelphia: WB Saunders. 89-195.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20(12): 570-7.
- Robenek H, Hofnagel O, Buers I, Robenek MJ, Troyer D, Severs NJ. 2006. Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *J Cell Sci.* 119: 4215–24.
- Robert-Gangneux F, Dardé ML. 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 25(2): 264-96.
- Romano JD, Sonda S, Bergbower E, Smith ME, Coppens I. 2013. *Toxoplasma gondii* salvages sphingolipids from the host Golgi through the rerouting of selected Rab vesicles to the parasitophorous vacuole. *Mol Biol Cell.* 24(12): 1974–1995.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron.* 16: 675–686.
- Rougier S, Montoya JG, Peyron F. 2016. Lifelong Persistence of *Toxoplasma* Cysts: A Questionable Dogma? *Trends in Parasitology.* 33(2): 93-101.
- Sahm M, Fischer HG, Gross U, Reiter-Owona I, Seitz HM. 1997. Cyst formation by *Toxoplasma gondii* *in vivo* and in brain-cell culture: a comparative morphology and immunocytochemistry study. *Parasitol Res.* 83: 659-665.
- Saka HA, Valdivia R. 2012. Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 28: 411–37.
- Santo-Domingo J, Demarex N. 2010. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1797(6-7): 907-12.
- Sattler R, Rothstein JD. 2006. Regulation and dysregulation of glutamate transporters. *Handb Exp Pharmacol.* 175: 277–303.
- Schildge S, Bohrer C, Beck K, Schachtrup C. 2013. Isolation and Culture of Mouse Cortical Astrocytes. *Journal of Visualized Experiments.* 71. pii: 50079. doi: 10.3791/50079.
- Schlüter D, Däubener W, Schares G, Groß U, Pleyer U, Lüder C. 2014. Animals are key to human toxoplasmosis. *Int J Med Microbiol.* 304(7): 917-29.
- Schwab JC, Beckers CJ, Joiner KA. 1994. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(2): 509-13.

- Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C. 2006. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci*. 7: 194–206.
- Sensenbrenner M, Devilliers G, Bock E, Porte A. 1980. Biochemical and ultrastructural studies of cultured rat astroglial cells: effect of brain extract and dibutyryl cyclic AMP on glial fibrillary acidic protein and glial filaments. *Differentiation*. 17: 51–61.
- Sheiner L, Santos JM, Klages N, Parussini F, Jemmely N, Friedrich N, Ward GE, Soldati-Favre D. 2010. *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. *Mol Microbiol*. 77(4): 912-29.
- Shen B, Sibley LD. 2012. The moving junction, a key portal to host cell invasion by apicomplexan parasites. *Curr Opin Microbiol*. 15(4): 449-55.
- Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM. 2009. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Phil Trans R Soc B*. 364: 2749–2761.
- Sibley LD. 2011. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev*. 240(1): 72–91.
- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. 1999. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6 ed. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Simard M, Nedergaard M. 2004. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*. 129: 877– 896.
- Sims TA, Hay J, Talbot IC. 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 AP, Joiner KA 1997a. Safe Haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu Rev Microbiol*. 51: 415-462.
- Sinai AP, Webster P, Joiner KA. 1997b. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci*. 110: 2117-2128.
- Sinai AP, Joiner KA. 2001. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J Cell Biol*. 154: 95-108.
- Sinai AP. 2008. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. *Subcell Biochem*. 47: 155-64.
- Soète M, Fortier B, Camus D, Dubremetz JF. 1993. *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. *Exp Parasitol*. 76(3): 259-64.
- Soète M, Camus D, Dubremetz JF. 1994. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii in vitro*. *Exp Parasitol*. 78: 361-370.
- Sofroniew MV. 2005. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist*. 11: 400-407.

- Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119: 7-35.
- Sorgi CA, Secatto A, Fontanari C, Turato WM, Belanger C, De Medeiros AI, Kashima S, Marleau S, Covas DT, Bozza PT, Faccioli LH. 2009. *Histoplasma capsulatum* cell wall {beta}-glucan induces lipid body formation through CD18, TLR2, and dectin-1 receptors: correlation with leukotriene B4 generation and role in HIV-1 infection. *J Immunol.* 182: 4025–4035.
- Souto XM, Barbosa HS, Menna-Barreto RF. 2016. The morphological analysis of autophagy in primary skeletal muscle cells infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research.* 115(7): 2853-2861.
- Spät A, Szanda G, Csordás G, Hajnóczky G. 2008. High- and low-calcium-dependent mechanisms of mitochondrial calcium signalling. *Cell Calcium.* 44(1): 51-63.
- Speer CA, Clark S, Dubey JP. 1998. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.* 84(3): 505–512.
- Splendore, A. 1908. Un nuovo protozoa parassita dei conigli incontrato nelle lesione anatomiche d'une malattia Che ricorda in molti ponti Il Kala-azar cell'uoma. Nota preliminare. *Revista da Sociedade Scientifica de São Paulo* 3. 109–112.
- Splendore, A. 1909. Sur un nouveau protozoaire parasite du lapin. *Buli Soc Path Exot.* 2: 462-464.
- Stenzel W, Soltek S, Schlüter D, Deckert M. 2004. The intermediate filament GFAP is important for the control of experimental murine *Staphylococcus aureus*-induced brain abscess and *Toxoplasma* encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 63: 631–640.
- Struzynska L, Bubko I, Walski M, Rafalowska U. 2001. Astroglial reaction during the early phase of acute lead toxicity in the adult rat brain. *Toxicology.* 165: 121–131.
- Su C, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka JW, Sibley LD. 2003. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science.* 299: 414–416.
- Sukthana Y. 2006. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trends in Parasitology.* 22(3): 137-142.
- Sullivan WJ Jr, Jeffers V. 2012. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol Rev.* 36(3): 717-733.
- Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. 1988. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* 240: 516-8.
- Suzuki Y, Conley FK, Remington JS. 1989. Importance of endogenous IFN- γ for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J Immunol* 143: 2045-2050.
- Suzuki Y, Yang Q, Conley FK, Abrams JS, Remington JS. 1994. Antibody against interleukin-6 reduces inflammation and numbers of cysts in brains of mice with toxoplasmic encephalitis. *Infect Immun.* 62(7): 2773-2778.

- Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. 2004. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med.* 4: 193–205.
- Swierzy IJ, Lüder CG. 2015. Withdrawal of skeletal muscle cells from cell cycle progression triggers differentiation of *Toxoplasma gondii* towards the bradyzoite stage.
- Swisher CN, Boyer K, McLeod R. 1994. Congenital toxoplasmosis. The Toxoplasmosis Study Group. *Semin Pediatr Neurol.* 1(1): 4-25.
- Takács AC, Swierzy IJ, Lüder CGK. 2012. Interferon- γ Restricts *Toxoplasma gondii* Development in Murine Skeletal Muscle Cells via Nitric Oxide Production and Immunity-Related GTPases. *Plos One.* 7(9): e45440.
- Tahara M, Andrabi SB, Matsubara R, Aonuma H, Nagamune K. 2016. A host cell membrane microdomain is a critical factor for organelle discharge by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Int.* 65(5 Pt A): 378-88.
- Tardieux I, Baum J. 2016. Reassessing the mechanics of parasite motility and host-cell invasion. *J Cell Biol.* 214(5): 507-15.
- Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem.* 277: 44507–44512.
- Taylor GA, Collazo CM, Yap GS, Nguyen K, Gregorio TA, Taylor LS, Eagleson B, Secret L, Southon EA, Reid SW *et al.* 2000. Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN- γ -inducible gene IGTP. *Proc Natl Acad Sci. USA* 97: 751–755.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 30(12-13): 1217-1258.
- Thiam AR, Farese RVJr., Walther TC. 2013. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14: 775–786.
- Toledo DAM, D'Avila H, Melo RCN. 2016. Host lipid bodies as platforms for intracellular survival of protozoan parasites. *Front Immunol.* 7: 174.
- Trimmer PA, Reier PJ, Oh TH, Eng LF. 1982. An ultrastructural and immunocytochemical study of astrocytic differentiation *in vitro*. *Journal of Neuroimmunology.* 2(3-4): 235-260.
- van der Meer-Janssen YPM, van Galen J, Batenburg JJ, Helms JB. 2010. Lipids in host-pathogen interactions: Pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Progress in Lipid Research.* 49: 1-26.
- Verardo MR, Lewis GP, Takeda M, Linberg KA, Byun J, Luna G, Wilhelmsson U, Pekny M, Chen DF, Fisher SK. 2008. Abnormal reactivity of muller cells after retinal detachment in mice deficient in GFAP and vimentin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49: 3659-3665.

- Vommaro RC, Attias M, de Souza W. 2014. A interação de *Toxoplasma gondii* com a célula hospedeira. In: de Souza W, Belfort Jr R. Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii*. Rio de Janeiro: Fiocruz. 69-81.
- Yamamoto M, Takeda K. 2012. Inhibition of ATF6 β -dependent host adaptive immune response by a *Toxoplasma* virulence factor ROP18. *Virulence*. 3:1, 77-80.
- Waltermann M, Hinz A, Robenek H, Troyer D, Reichelt R *et al.* 2005. Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up. *Mol Microbiol*. 55: 750–63.
- Walther TC, Farese RV Jr. 2009. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta*. 1791: 459-66.
- Weilhammer DR, Iavarone AT, Villegas EN, Brooks GA, Sinai AP, Sha WC. 2012. Host metabolism regulates growth and differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 42(10): 947-959.
- Weiss LM, Laplace D, Takvorian PM, Tanowitz HB, Cali A, Wittner M. 1995. A cell culture system for study of development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *J Euk Microbiol*. 42(2): 150-157.
- Weiss LM, Dubey JP. 2009. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol*. 39(8): 895-901.
- Weiss LM, Kim K. 2007. *Toxoplasma gondii*: The model Apicomplexan. Perspectives and Methods. Elsevier. 5 ed.
- Weiss LM, Kim K. 2011. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosc*. 5: D391–D405
- Weiss LM, Kim K. 2013. *Toxoplasma gondii* The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods. 2 ed. New York: Academic Press. 521–551.
- Welte MA. 2015. Expanding roles for lipid droplets. *Curr Biol*. 25(11): R470-R481.
- White MW, Radke JR, Radke JB. 2014. *Toxoplasma* development – turn the switch on or off?. *Cell Microbiol*. 16(4): 466-472.
- Wilfling F, Thiam AR, Olarte MJ, Wang J, Beck JR, Gould TJ, Allgeyer ES, Pincet F, Bewersdorf J, Farese RV Jr., Walther TC. 2014. Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting. *eLife*. 3:e01607.
- Zhang SO, Box AC, Xu N, Le Men J, Yu J *et al.* 2010. Genetic and dietary regulation of lipid droplet expansion in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci. USA* 107: 4640–45.
- Zhang YW, Halonen SK, Ma YF, Wittner M, Weiss LM. 2001. Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infect Immun*. 69: 501-507.