

## *Campus Realengo*

### Curso de Graduação em Farmácia

Anne Caroline da Silva  
Braga Marcos

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS  
MICROVASCULARES CEREBRAIS DURANTE A INFECÇÃO POR  
TOXOPLASMA GONDII: ESTUDO DA PROPRIEDADE DE  
BARREIRA BIOLÓGICA**

Rio de Janeiro

2020

ANNE CAROLINE DA SILVA BRAGA MARCOS

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS  
MICROVASCULARES CEREBRAIS DURANTE A INFECÇÃO POR  
*TOXOPLASMA GONDII*: ESTUDO DA PROPRIEDADE DE BARREIRA  
BIOLÓGICA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto Federal do Rio de  
Janeiro, como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadores: Camila Alves Bandeira  
Falcão e Daniel Adesse.

Rio de Janeiro  
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.

Elaborada por Karina Barbosa dos Santos

Bibliotecária - CRB 7 nº 6212

M321

Marcos, Anne Caroline da Silva Braga

Avaliação da integridade de células endoteliais microvasculares cerebrais durante a infecção por *Toxoplasma gondii*: estudo da propriedade de barreira biológica. / Anne Caroline da Silva Braga Marcos, 2021.

44f.

Orientador(a): Profª. Dsc. Camila Alves Bandeira.

Coorientador(a): Prof. Dr. Daniel Adesse.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia) – Instituto Federal do Rio de Janeiro, 2021.

1. Barreira Hemato-encefálica. 2. Célula endotelial microvascular cerebral. 3. *T. gondii*. 4. ZO-1. I. Instituto Federal do Rio de Janeiro. Campus Realengo. II. Bandeira, Camila Alves. III. Adesse, Daniel. IV. Título.

COBIB/CReal

CDU 615

ANNE CAROLINE DA SILVA BRAGA MARCOS

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS  
MICROVASCULARES CEREBRAIS DURANTE A INFECÇÃO POR  
TOXOPLASMA GONDII: ESTUDO DA PROPRIEDADE DE BARREIRA  
BIOLÓGICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto Federal do Rio de Janeiro como  
requisito parcial para a obtenção do grau de  
Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 18 / 12 / 2020.

Banca Examinadora



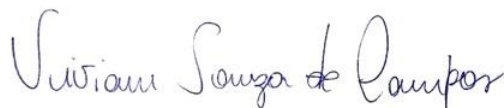
---

Prof<sup>a</sup>. Dsc. Camila Alves Bandeira - (Orientadora)  
Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ)



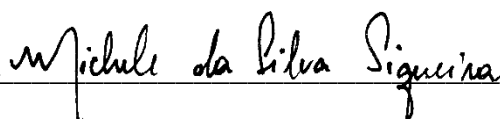
---

Prof. Dr Daniel Adesse (Orientador externo)



---

MSc. Viviane Souza de Campos  
Membro



---

MSc. Michele da Silva Siqueira  
Membro

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por ter me capacitado e aos meus pais Julio Cesar e Bárbara Simone por todo suporte ao longo da minha trajetória.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por ter tornado este sonho possível.

Ao meu pai Julio Cesar e minha mãe Barbara Simone por serem os meus maiores incentivadores, refúgio nos momentos difíceis e também responsáveis pelo que sou hoje.

Ao meu irmão Julio Junior por apoiar todas as minhas escolhas e por ser meu amigo, me proporcionando momentos de descontração nos meus dias.

À minha avó Sidneia e aos meus primos José e Larianne que sempre me incentivaram e me deram suporte emocional neste processo.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Daniel Adesse, Prof<sup>a</sup>. Dr Joice Stipursky e Prof<sup>a</sup>. Dr. Camila Falcão por todos os ensinamentos e paciência comigo ao longo desses anos de trabalho. Vocês são minhas inspirações!

Às minhas amigadas do LBE e LNBC por toda troca, ensinamento, paciência, amizade, longas conversas e por sempre me cederem um tempinho no fluxo.

Aos meus professores do IFRJ- Campus Realengo por serem excelentes mestres. Sempre terei um pouco de vocês em mim! Muito obrigada!

Ao meu grupo HSM do IFRJ que foi essencial para a minha trajetória na faculdade e na minha vida pessoal ao longo destes 5 anos. Sem elas tudo seria mais difícil. Muito obrigada por cada choro, tristeza, risos e comidas compartilhadas.

Em especial a minha amiga Vitória por ter segurado a minha mão em todos os momentos ao longo da graduação.

Às minhas amigas da vida: Jéssica, Amanda e Letícia. Obrigada por serem meu suporte emocional, por cada oração e por permanecerem ao meu lado em todos os momentos.

## RESUMO

Toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* que pode afetar todos os animais de sangue quente, incluindo humanos. O parasito pode infectar diversos tecidos do hospedeiro na fase inicial da doença, mas em sua fase crônica desenvolve latência através de cistos teciduais formados por bradizoítos. Estes cistos são localizados majoritariamente no tecido muscular e no Sistema Nervoso Central (SNC). Uma vez dentro do cérebro, o parasito parece ser capaz de infectar todos os tipos celulares que compõe este tecido e foi descrito recentemente que as células endoteliais microvasculares cerebrais (BMECs) podem servir como forma de entrada do parasito no SNC, através de sua infecção direta. Células endoteliais estão mecanicamente acopladas entre si por junções ocludentes (*Tight Junctions*), conferindo maior integridade à BHE e proteção do parênquima cerebral. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da infecção por *T. gondii* na biologia das BMECs, bem como seu efeito na propriedade de barreira, *in vitro*. Para isso, foi utilizado uma linhagem celular endotelial microvascular do córtex cerebral de camundongos (bEnd.3) e plaqueamos em lamínulas de vidro e infectadas com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME49. Após 24 horas de infecção, as células foram processadas para imunocitoquímica, com marcação para ZO-1 (uma proteína de suporte para as *tight junctions*), Ki67 (marcador de proliferação) e um intercalante de DNA (DAPI). A intensidade da marcação de ZO-1 foi medida pelo software ImageJ. Também foi avaliado pelo ImageJ o perfil de organização da *tight junction* pelo macro TiJOR do ImageJ. Para medir a resistência elétrica transendotelial (TEER) células foram plaqueadas em insertos transwell com poro de 8 mm. A partir destas análises foi observado uma redução da imunorreatividade para ZO-1 em culturas infectadas de 35%, acompanhada de uma redução na TEER de 40% e redução do TiJOR de 48%. Não foi observada alteração significativa nas taxas de proliferação celular em culturas infectadas. Com os dados gerados neste trabalho, concluímos que a infecção por *T. gondii* gera perda na propriedade de barreira das células endoteliais cerebrais.

**Palavras-chave:** Barreira Hemato-encefálica, célula endotelial microvascular cerebral, *T. gondii*, ZO-1

## ABSTRACT

Toxoplasmosis is a disease caused by the obligate intracellular protozoan *Toxoplasma gondii* that can affect all warm-blooded animals, including humans. The parasite can infect several tissues of the host in the initial phase of the disease, but in its chronic phase it develops latency through the formation of tissue cysts composed by bradyzoites. These cysts are located mainly in the muscle tissue and in the Central Nervous System (CNS). Once inside the brain, the parasite appears to be able to infect all cell types that make up this tissue and it has recently been described that brain microvascular endothelial cells (BMECs) can serve as a way for the parasite to enter the CNS through its direct infection. Endothelial cells are mechanically coupled to each other by tight junctions, which confers greater integrity to the BBB and protection of the cerebral parenchyma. Therefore, the objective of this work is to evaluate the effect of *T. gondii* infection on the biology of BMECs, as well as its effect on the barrier property, in vitro. For this, a microvascular endothelial cell line from the cerebral cortex of mice (bEnd.3) was used and plated on glass coverslips and infected with *T. gondii* tachyzoites of the ME49 strain. After 24 hours of infection, cells were processed for immunocytochemistry, labeled for ZO-1 (a tight junction scaffolding protein), Ki67 (proliferation marker) and a DNA intercalator (DAPI). The intensity of the ZO-1 marking was measured by the ImageJ software. The tight junction organization profile was also evaluated by ImageJ using the TiJOR macro from ImageJ. To measure transendothelial electrical resistance (TEER), cells were plated on transwell inserts with an 8 mm pore. From these analyzes, a reduction of immunoreactivity for ZO-1 in infected cultures of 35% was observed, accompanied by a reduction in TEER of 40% and reduction of TiJOR of 48%. No significant changes were found in infection-induced bEnd.3 cell proliferation rates. We conclude from the data presented in this work that infection by *T. gondii* generates loss in the barrier property of brain endothelial cells.

**Keywords:** Blood-Brain Barrier, brain microvascular endothelial cell, *T. gondii*, ZO-1



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJ	Junção aderente
BEC	Célula endotelial cerebral
BHE	Barreira Hemato-Encefálica
BMEC	Célula endotelial microvascular cerebral
BSA	Albumina de Soro Bovino
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
JAM	Molécula de Adesão Juncional
LAM	Molécula de adesão a leucócitos
NVU	Unidade Neurovascular
PBS	Tampão fosfato salino
PFA	Paraformaldeído
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TEER	Resistencia elétrica transendotelial
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TiJOR	Taxa de Organização de Junção Tight
TJ	<i>Tight Junction</i>
ZO	<i>zona occludens</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
1.1 BARREIRA HEMATO-ENCEFÁLICA .....	10
1.1.1 Células endoteliais cerebrais .....	12
1.2 TOXOPLASMOSE .....	14
1.2.1 Ciclo evolutivo do <i>T. gondii</i> .....	15
1.2.2 Patogenicidade .....	17
1.2.3 Prevalência .....	18
1.2.4 Interação parasito- BMECs .....	18
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>20</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
3.1 OBJETIVO GERAL: .....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	21
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>22</b>
4.1 MANUTENÇÃO DA LINHAGEM BEND.3 (CÉLULAS ENDOTELIAIS MICROVASCULARES CEREBRAIS DE CAMUNDONGO) .....	22
4.2 MANUTENÇÃO DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> .....	22
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL .....	23
4.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA .....	23
4.5 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS .....	24
4.6 RESISTÊNCIA ELÉTRICA TRANS-ENDOTELIAL (TEER) .....	24
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	25
4.8 CONFORMIDADE COM O COMITÊ DE ÉTICA .....	25
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
5.1 A INFECÇÃO POR <i>T. GONDII</i> ALTERA A PROPRIEDADE DE BARREIRA DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS POR MEIO DA RESISTÊNCIA ELÉTRICA TRANSENDOTELIAL .....	26
5.2 A INFECÇÃO POR <i>T. GONDII</i> DIMINUI A IMUNOREATIVIDADE DE ZO-1 .....	26
5.3 O PERFIL DE PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS BEND.3 NÃO É ALTERADO DURANTE INFECÇÃO POR <i>T. GONDII</i> .....	28
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>32</b>

## 1. INTRODUÇÃO

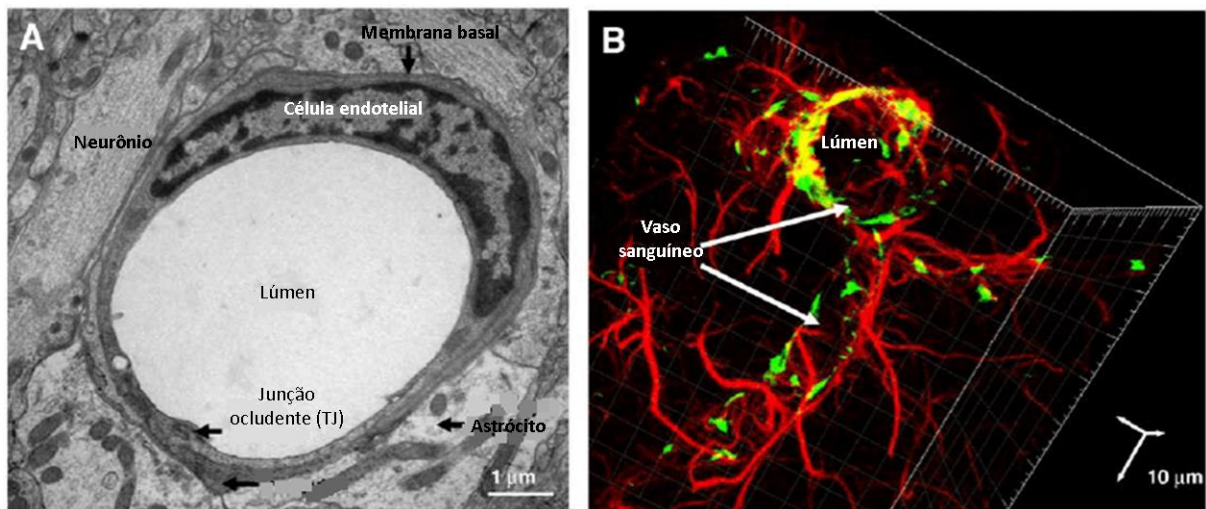
### 1.1 BARREIRA HEMATO-ENCEFÁLICA

O Sistema Nervoso Central (SNC) é formado por uma diversidade celular, incluindo neurônios e células gliais e é responsável por diversas atividades desempenhadas pelo organismo, como o envio de ordens, decisões, relação com o ambiente e atividades intelectuais (GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013). Para que ocorra a sinalização neural confiável, é necessária a regulação iônica do microambiente neural (ABBOTT, 1992). Este sistema é composto pela medula espinhal e pelo encéfalo, sendo separado dos demais sistemas por uma interface de barreiras: física, de transporte e metabólica (ABBOTT, 2004; ABBOTT; RONNBACK; HANSSON, 2006; ABBOTT *et al.*, 2010).

A Barreira Hemato-encefálica (BHE) constitui uma interface entre o SNC e o sanguíneo, mantém a homeostase do microambiente cerebral para o funcionamento saudável do SNC da maioria dos vertebrados, incluindo anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos (ABBOTT, 2002; CSERR; BUNDGAARD, 1984; MAYER *et al.*, 2009). Esta barreira protege o parênquima cerebral de entrar em contato com moléculas tóxicas e patogênicas, limitando a difusão passiva de nutrientes polares do sangue para o cérebro e regulando seletivamente a migração de células do sistema imunológico (ABBOTT; RONNBACK; HANSSON, 2006; BEGLEY; BRIGHTMAN, 2003; LUISSINT *et al.*, 2012; WOLBURG *et al.*, 2009).

A BHE é organizada por células endoteliais, astrócitos, membrana basal (composta por proteínas de matriz extracelular), pericitos e complexos juncionais (DANEMAN, 2012; HAWKINS; DAVIS, 2005; SANDOVAL; WITT, 2008). A associação da BHE com células sanguíneas e neurônios forma a Unidade Neurovascular (*Neurovascular Unit*, NVU), uma interface altamente dinâmica, com a finalidade de proteger o acesso ao SNC (ABBOTT; RONNBACK; HANSSON, 2006; NEUWELT *et al.*, 2011) (**Figura 1**). As células endoteliais têm cerca de 20% de sua superfície coberta por pericitos, que regulam o fluxo sanguíneo no capilar do cérebro através de contração e relaxamento. Os astrócitos representam a maior parte das células da glia e conectam os capilares aos neurônios do cérebro, fornecendo nutrientes e participando da manutenção e integridade da BHE (ARMULIK; ABRAMSSON;

BETSHOLTZ, 2005; ARMULIK; GENOVÉ; BETSHOLTZ, 2011; EUGENIN *et al.*, 2011; HIRRLINGER; DRINGEN, 2010; JESPERSEN; ØSTERGAARD, 2012).

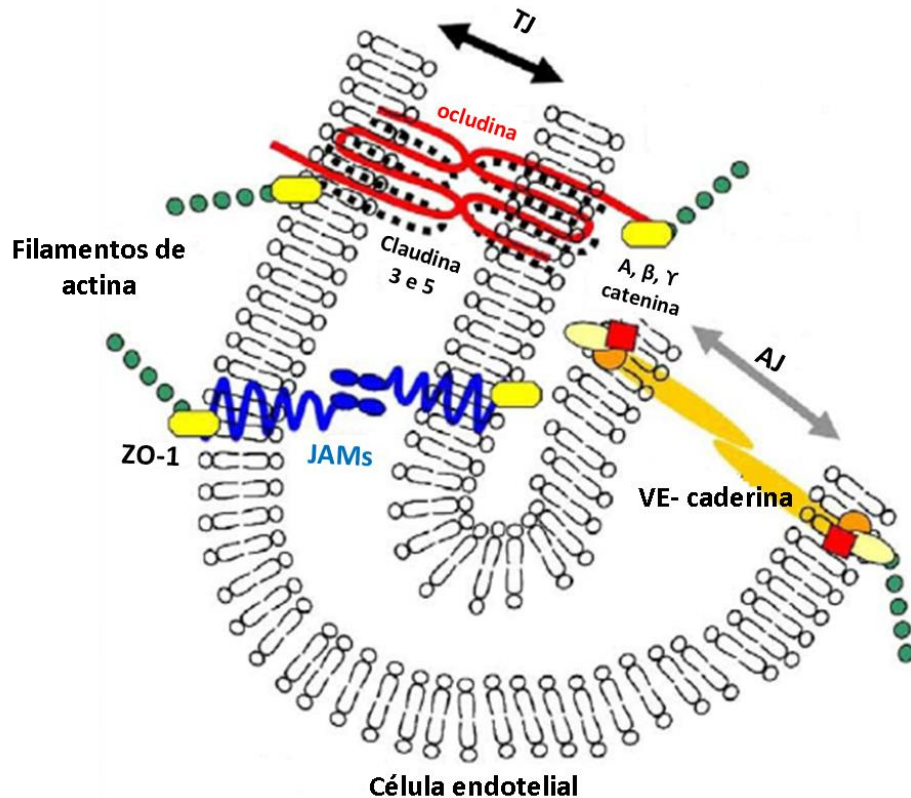


**Figura 1:** Unidade Neurovascular. **A:** microscopia eletrônica de transmissão de um corte do cérebro de rato evidenciando a associação da Barreira Hematoencefálica aos neurônios vizinhos, formando a NVU. **B:** reconstrução 3D de microscopia confocal do cérebro de rato mostrando parte da árvore vascular cerebral: células endoteliais (em vermelho) cobertas por pericitos (em verde). **Fonte:** Adaptado de WEISS *et al.* (2008).

Células endoteliais são mecanicamente acopladas entre si para garantir a integridade da BHE, formando a barreira de proteção do parênquima cerebral que limita a difusão paracelular de substâncias polares do sangue evitando o vazamento de solutos, íons, água e moléculas tóxicas no interstício cerebral, garantindo desta forma que a BHE apresente alta impermeabilidade (CEREJIDO *et al.*, 1998; GUMBINER, 1993; MCDANNOLD *et al.*, 2012; SUKITA; FURUSE; ITOH, 2001). Este acoplamento se dá através de junções celulares ocludentes (*tight junctions*, TJs).

As TJs consistem em junções extremamente compactadas de proteínas que abrangem o complexo intercelular como as claudinas, ocludinas, moléculas de adesão juncional e proteínas acessórias de suporte, principalmente a família das *zona occludens* (ZO-1, 2 e -3) (LUISSINT *et al.*, 2012; WOLBURG; LIPPOLDT, 2002; WOLBURG *et al.*, 2009). A ocludina e a claudina estão ligadas às proteínas de suporte ZO, proteínas reguladoras e cingulinas (MITIC; VAN ITALLIE; ANDERSON, 2000). Estas junções acoplam as células endoteliais, fornecendo suporte ao tecido, estruturando a BHE (BEGLEY; BRIGHTMAN, 2003; WOLBURG *et al.*, 2009). A eficácia das TJs parecem estar relacionadas às isoformas da ZO que ligam as claudinas e ocludinas via cingulina aos filamentos de actina do citoesqueleto (BAUER;

TRAWEGER; BAUER, 2004; LUISSINT *et al.*, 2012; TIETZ; ENGELHARDT, 2015; WOLBURG *et al.*, 2009; WOLBURG; LIPPOLDT, 2002).

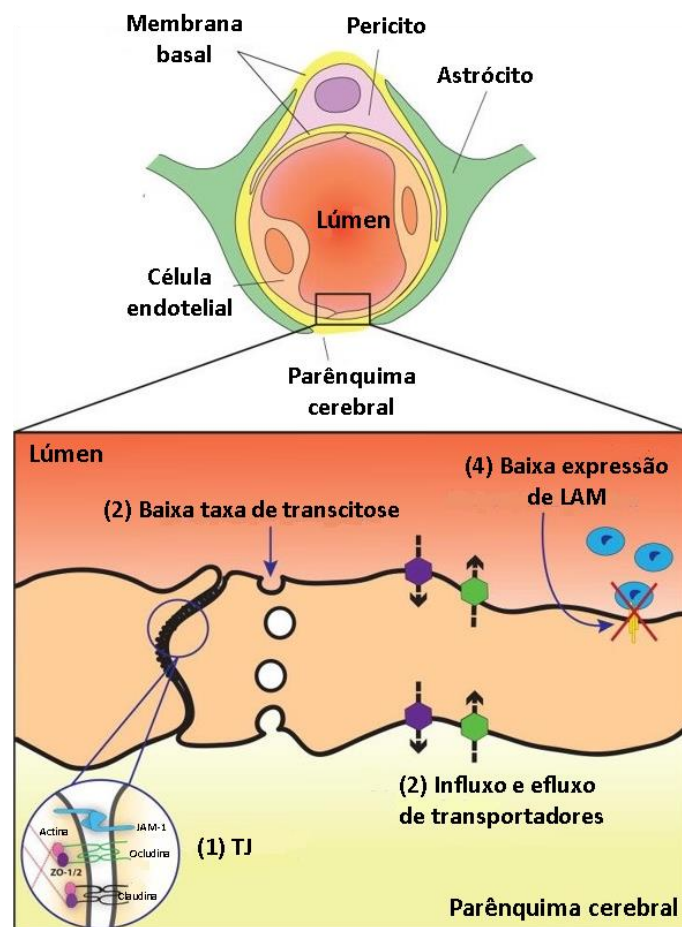


**Figura 2:** Esquema representativo do complexo juncional de células endoteliais da barreira hematoencefálica. As BMECs mantêm contato intercelular pela presença das TJs constituídas por proteínas transmembrana: ocludina e claudinas (claudina-3 e -5) associadas ao citoesqueleto de actina via proteínas citosólicas como a família das ZO. Periféricamente às TJs estão as JAMs e proteínas localizadas de junções aderentes (AJ), como a VE-caderina, que também está associada ao citoesqueleto de actina via cateninas. **Fonte:** Adaptado de WEISS *et al.* (2008).

### 1.1.1 Células endoteliais cerebrais

O endotélio permite a rápida difusão do oxigênio do sangue para o cérebro e de dióxido de carbono do cérebro ao sangue para manter o metabolismo normal e regular o pH do microambiente cerebral e do líquido cefaloraquidiano da medula espinhal. Ao restringir severamente a difusão paracelular de íons e solutos polares das células endoteliais, as TJs geram bloqueio na penetração de macromoléculas (acima de 40 Daltons) por essa via, resultando em alta resistência elétrica na BHE de  $\sim 1800 \Omega \times \text{cm}^2$  (BUTT *et al.*, 1990; PARDRIDGE; BOADO; FARRELL, 1990).

As células endoteliais cerebrais (BECs), quando comparadas com células endoteliais periféricas, apresentam baixa taxa de transcitose, que consiste no transporte entre as membranas celulares de macromoléculas como albumina, lipoproteína de baixa densidade e hormônios como insulina e leptina (HOLLY; PERKS, 2006; XIAO; GAN, 2013). Estas células também apresentam nível baixo de expressão de moléculas de adesão de leucócitos em comparação com células endoteliais de tecidos não neurais, restringindo o número de células imunes que entram no SNC (ANDREONE; LACOSTE; GU, 2015; DANEMAN; PRAT, 2015) (**Figura 3**).



**Figura 3:** Imagem representativa da NVU a nível de um capilar do SNC. Os vasos são revestidos por uma camada de células endoteliais, fornecendo a propriedade de barreira. Astrócitos e pericitos envolvem essa camada endotelial fornecendo suporte funcional para a manutenção da BHE. Em uma visão ampliada do endotélio, destacam-se quatro propriedades que contribuem para a integridade da BHE pelo rígido controle durante a troca de íons e nutrientes entre o sangue e o cérebro. (1) As interações célula-célula são mediadas pelas *Tight junctions*, molécula de adesão juncional-1 (JAM-1), occludina e membros da família da claudina e interligadas ao citoesqueleto pelas proteínas adaptadoras ZO-1 e ZO-2, controlando o fluxo paracelular entre células endoteliais. (2) As células endoteliais exibem taxas extremamente baixas de transcitose, pois o tráfego vesicular de íons e nutrientes através das células é mínimo. (3) Estas células expressam transportadores de influxo (hexágonos roxos) e efluxo (hexágonos verdes) que transportam nutrientes para o cérebro e removem toxinas potencialmente prejudiciais, respectivamente. (4) A baixa expressão de moléculas de adesão de leucócitos (LAM) resulta na manutenção de baixos níveis do sistema imunológico no SNC. **Fonte:** Adaptado de ANDREONE; LACOSTE (2015).

A integridade funcional e estrutural da BHE depende de células endoteliais microvasculares cerebrais (BMECs) que revestem os capilares do cérebro (SPINDLER; HSU, 2012). Brown, Morris e O'Neil (2007) demonstraram que uma linhagem celular de BMECs de camundongos bEnd.3 expressa as proteínas ocludina, claudina 5, ZO-1 e ZO-2.

Uma desregulação ou disfunção da BHE pode iniciar ou contribuir para uma variedade de doenças neurovasculares, infecciosas, inflamatórias ou degenerativas do SNC, como acidente vascular cerebral isquêmico, encefalopatia por HIV, esclerose múltipla, doença de Alzheimer, doença de Parkinson ou até mesmo a neurotoxoplasmose (BLEAU *et al.*, 2015; LUSTIG *et al.*, 1992; NEUWELT *et al.*, 2011).

Alguns patógenos transmitidos pelo sangue desenvolveram estratégias para invadir a BHE e atingir o SNC. Existem diversos vírus, bactérias e protozoários que apresnetam a capacidade de acessar o parenquima, dentre eles o *Toxoplasma gondii* agente etiológico da toxoplasmose. (SPINDLER; HSU, 2012).

## 1.2 TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, que pode afetar todos os animais de sangue quente, incluindo humanos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Este parasito pertence ao filo apicomplexa pois apresenta o complexo apical que é composto por diferentes tipos de organelas secretoras como micronemas, grânulos densos e roptries, favorecendo seu processo de internalização na célula hospedeira (SHAW *et al.*, 1998; DUBREMETZ, 2007). Este processo é complexo e constituído por várias etapas, culminando na internalização do protozoário em um vacúolo citoplasmático, conhecido como vacúolo parasitóforo (HOWE *et al.*, 1997).

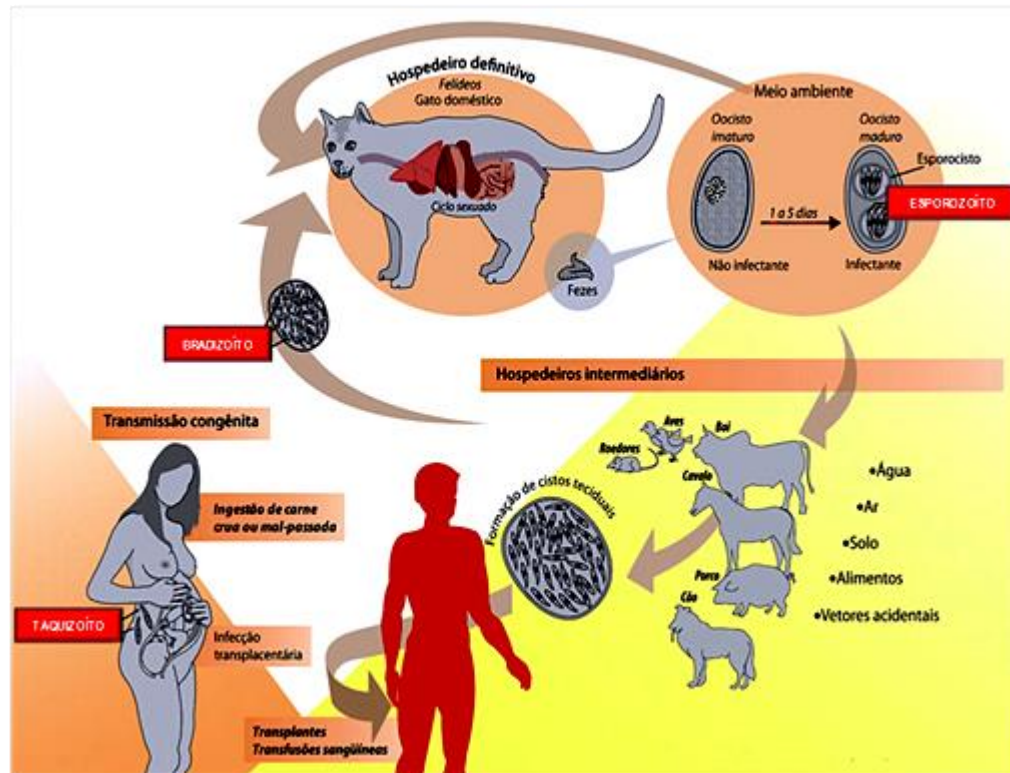
O *T. gondii* se apresenta em três principais linhagens clonais de relevância clínica e cepas com genótipo atípico de combinações alélicas incomuns, como é o caso das cepas circulantes na América do Sul (HOWE *et al.*, 1997). Estudos comparativos da análise molecular de cepas circulantes indicam que o genótipo do

parasito pode influenciar na gravidade da doença (GRIGG *et al.*, 2001; SIBLEY; AJIOKA, 2008). Curiosamente, estes estudos demonstram que a maioria das infecções, em humanos, na América do Norte e Europa são devidos a cepa do tipo II, que apresentam capacidade de produzir cistos teciduais. Já as cepas do tipo III estão mais relacionadas a animais. E as cepas tipo I apresentam prevalência aumentada em casos de toxoplasmose congênita, embora raro em animais (CARME *et al.*, 2002).

### 1.2.1 Ciclo evolutivo do *T. gondii*

Seu ciclo evolutivo envolve três formas infectivas: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (**Figura 4**). A forma taquizoíta apresenta multiplicação rápida e se dissemina no hospedeiro, caracterizando a fase aguda da infecção (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Em hospedeiros imunocompetentes, as respostas imunes inata e adaptativa conseguem controlar este estágio. No entanto, alguns taquizoítos permanecem no organismo e se diferenciam em bradizoítos, que apresentam replicação lenta e são reorganizados em cistos teciduais (GROSS *et al.*, 1996). Estes cistos se alojam preferencialmente em células nervosas ou musculares e podem permanecer por toda a vida do hospedeiro, de forma assintomática ou sintomática durante alteração no quadro imunológico do indivíduo (FERREIRA DA SILVA *et al.*, 2008). A conversão taquizoíto-bradizoíto é resultante do mecanismo de proteção do parasito com a formação da parede cística em resposta ao sistema imune do hospedeiro (FRENKEL, 1970; DUBEY *et al.*, 1998). A forma esporozoíta é resultante da reprodução sexuada do parasito nos enterócitos de felídeos. Esta forma está contida em esporocistos, dentro dos oocistos que são eliminados através das fezes destes animais (DUBEY, 1998).





**Figura 4.** Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*: O parasito realiza seu ciclo sexado no hospedeiro definitivo e libera oocistos ainda imaturos no ambiente. Após o amadurecimento tornam-se infectantes e hospedeiros intermediários pode se contaminar através da ingestão de alimentos cru, malcozidos ou por água contaminada. O parasito realiza seu ciclo assexuado no hospedeiro intermediário, onde também pode formar cistos teciduais contendo bradizoítos. A ingestão desses cistos presentes em tecidos de animais infectados é uma das principais fontes de contaminação, além da transmissão vertical do parasito. **Fonte:** Adaptado de MOURA et al. (2009).

O ciclo de vida do *T. gondii* envolve dois hospedeiros: sendo o hospedeiro definitivo restrito a felídeos e o intermediário, aves e mamíferos, incluindo humanos (BLACK; BOOTHROYD, 2000; DUBEY, 2009). Através da predação e carnivorismo, os hospedeiros definitivos podem ingerir cistos teciduais contendo bradizoítos ou ingerir ou inalar oocistos presentes no ambiente. As formas bradizoítas infectam os enterócitos dos felinos dando início a reprodução sexuada deste parasito, onde microgametas (formas masculinas) e macrogametas (formas femininas) se desenvolvem intracelularmente (DUBEY; FRENKEL, 1976). Os gametas masculinos são flagelados e infectam enterócitos vizinhos contendo os gametas femininos resultando na fecundação e formação de um zigoto diplóide e, posteriormente, oocisto não infectivo (FERGUSON; HUTCHISON; SIIM, 1975). Este oocisto imaturo é eliminado junto às fezes dos felinos, onde de 1 a 5 dias após a liberação, se torna maduro e capaz de infectar a água, ar, solo e alimentos (DUBEY, 1998).

Animais de sangue quente podem se infectar através da inalação ou da ingestão desses oocistos maduros presentes no solo ou alimentos contaminados, ou pela ingestão de carne crua ou malpassada contendo cistos teciduais deste parasito, se tornando hospedeiro intermediário, dando início ao ciclo assexuado. Os esporozoítos são liberados dos oocistos, infectam o epitélio intestinal e diferenciam-se em taquizoítos, caracterizando a fase aguda da doença, provocando uma reação imunológica modulada por células Th1 e liberação de IFN- $\gamma$ , o que leva à diferenciação destas formas em bradizoítas com formação de cistos teciduais, caracterizando a fase cônica da doença (SUZUKI *et al.*, 2005), concluindo assim o ciclo assexuado nos hospedeiros intermediários, caracterizando a infecção adquirida (BLACK; BOOTHROYD, 2000; DUBEY, 1998). A reativação ou re-agudização da doença pode ocorrer em casos de imunocomprometimento (como nos casos de pacientes com AIDS ou em tratamento com imunossuppressores após um transplante de órgãos), levando a ocorrência dos sintomas graves da doença com febre, linfadenopatia e mialgia, reativação de cistos teciduais levando a encefalite, calcificações cerebrais, meningite e danos oculares. Já a infecção crônica com *T. gondii* induz dores de cabeça, alterações comportamentais, cognitivos, podendo levar a epilepsia e até esquizofrenia (FRENKEL, 1970).

Outra possibilidade de transmissão da toxoplasmose é a transmissão vertical, podendo ocasionar a toxoplasmose congênita. Isto ocorre quando a mãe é infectada pela primeira vez durante a gravidez e a transmissão do parasito ao feto se dá pela placenta (CARLIER *et al.*, 2012).

### **1.2.2 Patogenicidade**

A patogenicidade da toxoplasmose, em humanos, normalmente está limitada a indivíduos imunocomprometidos ou à doença congênita. A gravidade da doença está intimamente relacionada ao quadro imunológico do indivíduo ou ao período gestacional, no caso da toxoplasmose congênita (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

Nas últimas décadas houve um crescimento populacional de imunocomprometidos e concomitantemente de casos mais graves de toxoplasmose. Com a reativação da doença, as manifestações clínicas são mais severas, como no

surgimento de lesões focais intracerebrais resultando em encefalite, podendo ser fatal se não tratada (WONG; REMINGTON, 1993). Já na toxoplasmose congênita, os danos podem resultar em abortos espontâneos ou em um amplo espectro de doenças clínicas como visão ligeiramente diminuída ou até mesmo a tétrede completa de sinais, incluindo retinocoroidite, hidrocefalia, convulsões e calcificação intracerebral (REMINGTON *et al.*, 2001; JONES *et al.*, 2001a).

### 1.2.3 Prevalência

*T. gondii* é um parasito comum que é capaz de infectar aves e mamíferos, incluindo o homem em todos os continentes. Aproximadamente 25-30% da população mundial está infectada com *T. gondii* (MAENZ *et al.*, 2014). No entanto, a soroprevalência varia muito entre os países (10-80%) e até mesmo em diferentes regiões de um mesmo país. As regiões do Sudeste Asiático, América do Norte (DUBEY; JONES, 2008) e norte da Europa apresentam baixa soroprevalência (10-30%). Prevalências entre 30-50% são observadas na Europa Central e Meridional, enquanto altas soroprevalências são relatadas na América Latina e países tropicais da África (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). A relação da prevalência de toxoplasmose congênita no Brasil é uma das maiores do mundo, com cerca de 36% de mulheres grávidas infectadas por *T. gondii*. Estudos apontam que a incidência de infecções no Brasil é muito maior do que em outros países como os EUA, por exemplo, com 56% contra 13% da população (DUBEY, 2010; DUBEY *et al.*, 2012; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). A explicação a essas diferenças na soropositividade se dá pela grande presença de cistos e oocistos de *T. gondii* no ambiente, além de hábitos alimentares específicos (MAENZ *et al.*, 2014).

### 1.2.4 Interação parasito- BMECs

Doenças infecciosas, no geral, apresentam alto potencial de causar disfunção na BHE, resultando em uma resposta inflamatória intensa no cérebro (CARRUTHERS; SUZUKI, 2007). Curiosamente, este é um dos órgãos de maior tropismo deste parasito. Para que *T. gondii* infecte o cérebro, é necessário que atravesse a BHE (ELSHEIKHA; KHAN, 2010). No entanto, os mecanismos

relacionados ao neurotropismo de *T. gondii* e a invasão deste parasito no SNC ainda não estão totalmente elucidados e têm sido o foco de diversos estudos dos últimos anos.

Existem algumas hipóteses descritas acerca do mecanismo pelo qual o parasito consegue acessar o SNC. Além dos processos de invasão para- e trans-celular e Cavallo de Tróia, recentemente foi demonstrado que a infecção das BMECs ocasiona a lise dessa barreira celular, permitindo a entrada dos parasitos no parênquima cerebral (KONRADT *et al.*, 2016). Uma vez dentro do cérebro, o parasito parece ser capaz de infectar todos os tipos celulares que compõem este tecido (LACHENMAIER *et al.*, 2011; LUDER *et al.*, 1999). Após uma extensa proliferação no tecido cerebral, o parasito parece possuir uma predileção para a formação de cistos teciduais (compostos por bradizoítos) dentro de neurônios (CABRAL *et al.*, 2016; MELZER *et al.*, 2010). Nosso grupo descreveu recentemente (ESTATO *et al.*, 2018) que durante a infecção adquirida por *T. gondii*, a permeabilidade vascular é aumentada e, com isso, a função microvascular também é alterada, contribuindo para a teoria de que o parasito gera um processo neuroinflamatório que é capaz de alterar a integridade da BHE.

Adicionalmente, nosso grupo demonstrou que infecção de células da Glia Radial, que são células-tronco do córtex cerebral, por *T. gondii* desempenha um papel modulador da função de BMECs. Quando tratadas com meio condicionado das culturas de glia radial infectadas, que contém fatores solúveis secretados por estas células, células endoteliais bEnd.3 apresentaram redução nos níveis de organização e imunorreatividade da proteína ZO-1, bem como da TEER destas culturas, em comparação com as culturas tratadas com meio condicionado proveniente de células da glia radial não infectada (MARCOS *et al.*, 2020).

Neste trabalho de conclusão de curso, avaliamos de que forma a interação direta de taquizoítas de *T. gondii* da cepa tipo II (ME49) com BMECs da linhagem bEnd.3, analisando alterações na imunorreatividade de ZO-1 e TEER destas células após a infecção.

## 2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é uma doença de alta prevalência a nível mundial. No Brasil, existe alta incidência de toxoplasmose congênita, que pode acarretar em diversas patologias irreversíveis no feto que perdurarão durante a vida do indivíduo. Pacientes imunocomprometidos também merecem atenção durante a infecção, pois a supressão do sistema imune facilita a disseminação do parasito para o cérebro e músculo esquelético. Em ambos os contextos a infecção por *T. gondii* pode apresentar as seguintes manifestações clínicas: calcificações cerebrais, hidro- e microcefalia, déficits cognitivos e motores, surdez e cegueira.

Danos na BHE são observados em pacientes e modelos experimentais de roedores de diversas patologias, e causam aumento de infiltrados de células inflamatórias e aumento de exposição do cérebro a toxinas. A quebra da BHE pode ser causada pela ruptura da interação entre células endoteliais, pericitos e astrócitos, levando à perda das *tight junctions*. Em modelo experimental de neuroinflamação por LPS, por exemplo, é observado um aumento considerável no transporte de citocinas através da BHE. (PYTEL; ALEXANDER, 2009).

Para observar os danos causados na BHE, vamos avaliar a expressão e a localização citoplasmática das proteínas da TJ que regulam a permeabilidade da BHE e verificar, por ensaio funcional, a resistencia elétrica transendotelial de células endoteliais microvasculares cerebrais durante a infecção por *T. gondii*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o efeito da infecção por *Toxoplasma gondii* na biologia das células endoteliais microvasculares cerebrais murinas, bem como seu efeito na propriedade de barreira, *in vitro*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Avaliar o efeito direto da infecção de células bEnd.3 por *T. gondii* na sua propriedade de barreira, incluindo sua resistência elétrica transendotelial (TEER);
- b) Verificar o impacto da infecção de células bEnd.3 por *T. gondii* na expressão e imunolocalização de uma proteína formadora da junção ocludente (*Tight Junction*), a ZO-1;
- c) Analisar a taxa de proliferação de células bEnd.3 durante a infecção por *T. gondii*;

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 MANUTENÇÃO DA LINHAGEM bEnd.3 (CÉLULAS ENDOTELIAIS MICROVASCULARES CEREBRAIS DE CAMUNDONGO)

Células bEnd.3 foram obtidas da ATCC e mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glucose suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina), com a troca do meio realizada de 2 em 2 dias para a manutenção das culturas (OMIDI *et al.*, 2003). Após a confluência, estas células foram expandidas para novas garrafas ou plaqueadas para experimentos. Para isso, as culturas foram lavadas duas vezes com solução salina (PBS 1x) e dissociadas com 1 ml de Tripsina-EDTA (para garrafas com diâmetro de 25 cm<sup>2</sup>) por 5 minutos a 37°C e inativadas com o meio de cultura gelado. Posteriormente, estas células foram centrifugadas a 1200 rpm por 7 minutos e contadas através da câmara de Neubauer. As células foram utilizadas entre as passagens 24 a 30.

### 4.2 MANUTENÇÃO DE *TOXOPLASMA GONDII*

Os parasitos da cepa ME49 (tipo II) foram mantidos em camundongos adultos da linhagem C57/BL6, infectados previamente (via intraperitoneal) com 50 cistos de *T. gondii*. Após 4-8 semanas de infecção, os cérebros dos camundongos foram isolados e submetidos à trituração e homogeneização na presença de tampão PBS, separados por centrifugação em gradiente de Dextran para isolamento dos cistos teciduais. Para obtenção de parasitos isolados, os cistos foram rompidos com solução de pepsina ácida e os bradizoitos isolados adicionados a monocamadas de células Vero. Após duas semanas em cultura, taquizoítos liberados no sobrenadantes foram coletados e utilizados nos experimentos, com multiplicidade de infecção de 3 parasitos para cada célula hospedeira (MOI 3) (LÜDER *et al.*, 1999).

#### 4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Células bEnd.3 foram plaqueadas em lamínulas de vidro redondas de 13 mm de diâmetro para imunofluorescência ou em insertos Transwell com poros 8  $\mu$ m para medir a resistência elétrica transendotelial com a densidade de 80.000 células por poço e mantidas com 500  $\mu$ L de meio DMEM High Glucose. Em placas contendo os insertos Transwell o volume de meio utilizado no compartimento superior (correspondente a face apical) foi de 200  $\mu$ L e no inferior (face basal), 300  $\mu$ L. Após 14 dias de cultivo, as células atingiram a confluência e foram infectadas com taquizoítos de ME49 com o MOI 3:1 por duas horas e, em seguida, lavadas duas vezes com PBS e mantidas na estufa com meio de cultura por mais 22h. Ao completar 24 horas de infecção, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 5 minutos para imunocitoquímica. Os sobrenadantes das culturas foram coletados, centrifugados e guardados a -80 °C para eventuais análises posteriores.

#### 4.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

A imunofluorescência indireta foi realizada por meio de adaptações do protocolo descrito por Siqueira e colaboradores (2008). As culturas foram fixadas em PFA 4% por 5 minutos e mantidas em PBS a 4°C. Em seguida, foram permeabilizadas com Triton x-100 a 0,05 % em PBS por 30 min. Sítios de ligação inespecífica foram bloqueados com BSA (albumina bovina sérica, Sigma-Aldrich) a 3% em PBS por 30 min e incubação dos anticorpos primários diluídos na solução de bloqueio *overnight* a 4°C. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-ZO-1 feito em camundongo (Invitrogen, 1:300) e o anti-Ki67 (marcador nuclear de células mitóticas, feito em coelho; Abcam, 1:100). Posteriormente, as células foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpos secundários conjugados com AlexaFluor 488 ou AlexaFluor 546 (Thermo), por 2 h em temperatura ambiente. O núcleo celular foi visualizado com DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indole; Sigma-Aldrich), incubado a 20 mg/mL por 5 minutos. As lamínulas de vidro foram montadas em lâminas de vidro com meio de montagem contendo DABCO em glicerol e PBS e visualizadas em um microscópio óptico de fluorescência Nikon TE3000. Foram capturadas quinze imagens de campos aleatórios da lamínula de pelo menos três experimentos independentes para posteriores análises.

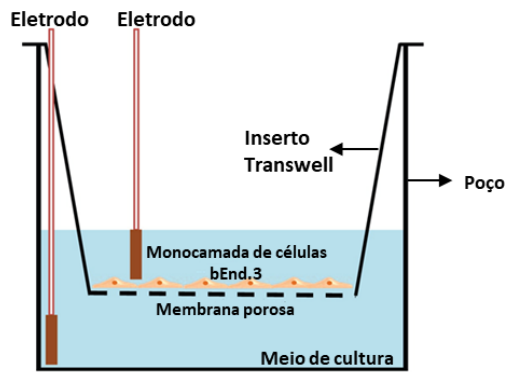


#### 4.5 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

As imagens de imunomarcção de ZO-1 capturadas pelo microscópio óptico de fluorescência Nikon TE3000 foram analisadas pelo macro TiJOR (Tight Junction Organization Rate) do software ImageJ, que é capaz de determinar a intensidade de fluorescência da ZO-1, além de caracterizar o perfil de organização das *tight junctions*. O software conta o número de interseções entre os polígonos criados na imagem e os picos de intensidade correspondentes à rede de proteínas e calcula a razão entre o número de picos de intensidade e o perímetro do polígono calculado em pixels. Essa relação é definida como a Taxa de Organização de Junção Tight (TiJOR), fornecendo o índice de localização destas proteínas na região de contato membrana-membrana de células adjacentes (TERRYN *et al.*, 2012). A análise de proliferação celular foi feita através da quantificação do percentual de células marcadas positivamente para Ki67 em relação ao número total de células em um campo microscópico, identificadas pela marcação por DAPI.

#### 4.6 RESISTÊNCIA ELÉTRICA TRANS-ENDOTELIAL (TEER)

Células bEnd.3 foram plaqueadas em insertos Transwell com poros 8  $\mu\text{m}$  revestidos com gelatina a 0,01 % e densidade de  $8 \times 10^4$  células por inserto (**Figura 5**). As células foram mantidas em meio para células bEnd.3 a 37°C e a resistência medida pelo aparelho Millicell-Electrical Resistance System (Millipore, Bedford, MA). Fizemos o acompanhamento da TEER até que estivesse com um mínimo de  $80 \Omega \times \text{cm}^2$ , quando então fizemos as infecções. Para calcular o TEER, fizemos uma leitura de um poço sem célula (branco) e o resultado foi subtraído da leitura de cada poço contendo células. O valor resultante é multiplicado por 0,33, que é a área do inserto e os resultados são expressos como  $\Omega \times \text{cm}^2$ . As condições experimentais foram culturas tratadas com meio DMEM High Glucose e culturas infectadas por *T. gondii* (SRINIVASAN *et al.*, 2015).



**Figura 5:** esquema representativo do cultivo celular em um inserto Transwell.

#### 4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O software GraphPad Prism 6.0 foi utilizado para as análises estatísticas. A significância estatística de pelo menos três experimentos independentes foi determinada pelo teste T não pareado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

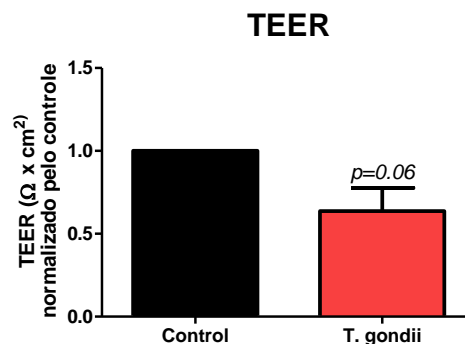
#### 4.8 CONFORMIDADE COM O COMITÊ DE ÉTICA

Os protocolos de experimentação com animais foram aprovados pelo Comitê de Pesquisa em Animais da Fiocruz (CEUA nºL-048/2015-A2).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 A INFECÇÃO POR *T. GONDII* ALTERA A PROPRIEDADE DE BARREIRA DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS POR MEIO DA RESISTÊNCIA ELÉTRICA TRANSENDOTELIAL

Para investigar se a infecção por *T. gondii* afeta a propriedade de barreira de BMECs, realizamos um ensaio funcional de resistência elétrica transendotelial (TEER). Para medir esta resistência é necessário plaquear as células em insertos Transwell com o poro de 8  $\mu\text{m}$  e acompanhar a confluência de 2 em 2 dias por aproximadamente 14 dias até que as células adquiram um fenótipo polarizado com a resistência de no mínimo 80  $\Omega \times \text{cm}^2$  para realizar a infecção. Durante a infecção por *T. gondii*, a TEER apresenta uma tendência de diminuição de 40%, indicando que a modificação estrutural das TJs pode exercer impacto na permeabilidade da monocamada das células endoteliais (**Figura 6**).

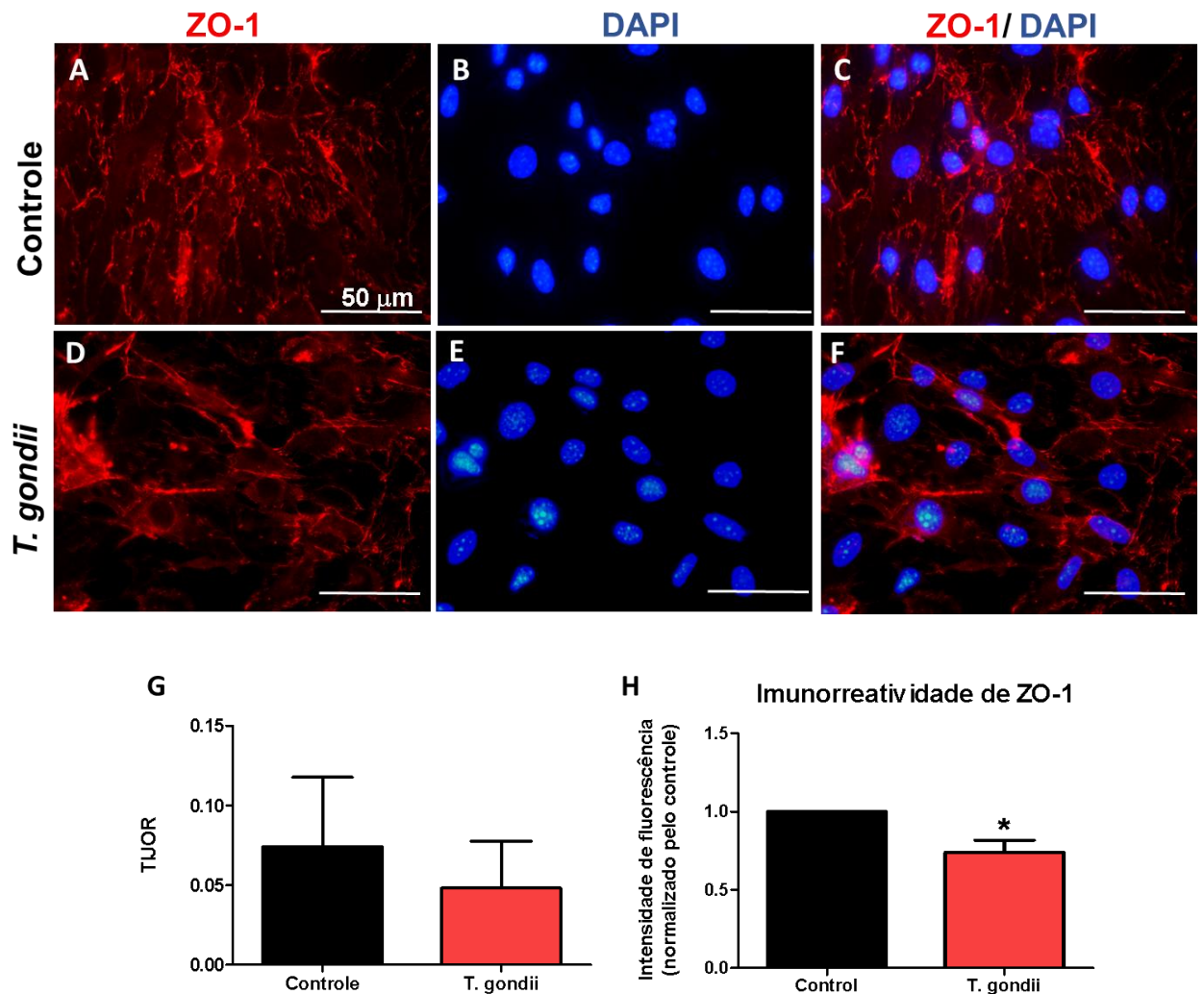


**Figura 6: Efeito da infecção de células bEnd.3 na TEER.** 24h após a infecção foi realizada a leitura da TEER das células plaqueadas nos insertos. Os resultados obtidos foram subtraídos do inserto sem célula (branco) e multiplicado por 0,3 que representa a área do inserto. Os valores das culturas infectadas foram normalizados pelos valores das culturas controle, que aqui correspondem a 1.0 (ou 100%) Foi observado que houve diminuição de 40% da TEER nas células bEnd.3 (N=3).

### 5.2 A INFECÇÃO POR *T. GONDII* DIMINUI A IMUNOREATIVIDADE DE ZO-1

Ao observar que a infecção por *T. gondii* causa diminuição da permeabilidade de BMECs, tivemos como próximo objetivo correlacionar este achado com a expressão/imunolocalização da proteína ZO-1 que exerce papel importante na propriedade de barreira destas células. Cultivamos células bEnd.3 até a confluência em lamínulas de vidro. Após atingir a confluência, a cultura foi infectada diretamente com taquizoítos de *T. gondii* da cepa ME49 (tipo II) por 2h e fixada após 24h da

infecção. Através de imunocitoquímica avaliamos o perfil da proteína reguladora ZO-1 distribuída no contato célula-célula e o núcleo foi visualizado pelo DAPI. Como resultado, culturas infectadas apresentam níveis reduzidos na imunorreatividade de ZO-1 (35%), avaliado pela intensidade de sua fluorescência. Ademais, verificamos uma diminuição, não estatisticamente significativa, nos níveis de organização dessas proteínas, que foi avaliado pelo macro TiJOR do ImageJ. Verificamos que as culturas controle tiveram média de índice de organização de 74%, enquanto que culturas infectadas apresentaram uma taxa de 48% (**Figura 7 A-H**). Os resultados obtidos pela macro TiJOR foram plotados no gráfico da Figura 7 como unidades arbitrárias, como informados pelo programa.

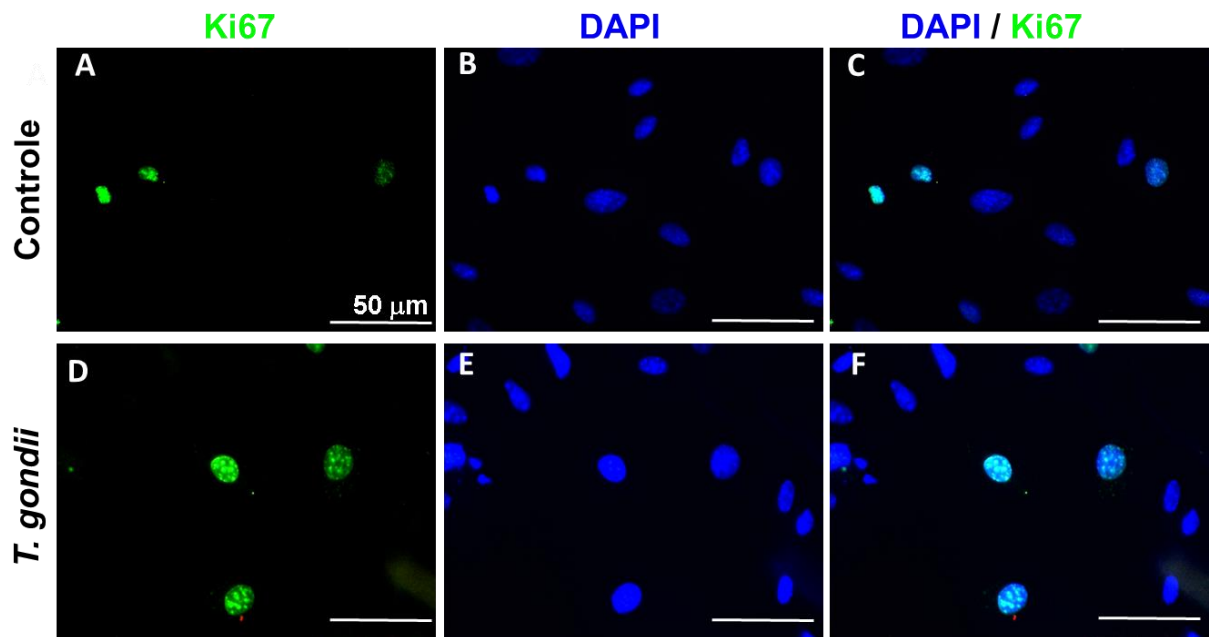


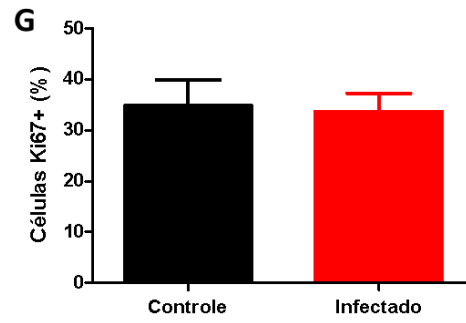
**Figura 7:** **A-F)** Cultura da linhagem celular bEnd.3 plaqueadas em lamínulas na densidade  $0,08 \times 10^6$ . **A-C)** células bEnd.3 imunomarcadas com ZO-1 controle; **D-F)** Cultura infectada com taquizoítos de ME49 na proporção 3:1; **G)** Análise do nível de organização das *Tight Junctions*, indicando que houve uma tendência a diminuição entre cultura infectada por *T. gondii* e controle; **H)** Intensidade de fluorescência da marcação de ZO-1 apresentando diminuição de 35%. Imagens obtidas de um

microscópio de fluorescência com a objetiva de 40x (N=3). \*:  $p=0,0155$  (N=3). Barras de calibração = 50  $\mu\text{m}$ .

### 5.3 O PERFIL DE PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS bEND.3 NÃO É ALTERADO DURANTE INFECÇÃO POR *T. GONDII*

Para avaliar o perfil de proliferação de células endoteliais bEnd.3 durante a infecção por *T. gondii*, nós utilizamos anticorpo para detectar a proteína Ki67, que é expressa em células durante a proliferação, nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular. Para esta avaliação, plaqueamos células bEnd.3 em lamínulas e, após atingirem a confluência da cultura, no 14º dia após o plaqueamento, algumas lamínulas foram infectadas por 24h com taquizoítos de *T. gondii*, fixadas com PFA a 4% e imunomarcadas com Ki67 e DAPI para visualização do núcleo celular (**Figura 8 A-G**). Nossos dados preliminares (N=2) sugerem que a infecção por *T. gondii* não altera a proliferação de células bEnd.3.





**Figura 8: A-G)** Cultura da linhagem celular bEnd.3 controle e infectada, respectivamente imunomarcadas com anti-Ki67 e DAPI. **G)** Através da imunomarcção para Ki67 não houve diferença significativa de proliferação celular durante a infecção. As células positivas para Ki67 foram quantificadas e normalizadas pelo número de células totais (DAPI). (N=2). Barras de calibração = 50  $\mu$ m.

## 6. DISCUSSÃO

A infecção por *T. gondii* com a cepa ME49 do tipo II apresentou uma tendência de redução na TEER em células bEnd.3, reduziu os níveis de expressão e organização da proteína ZO-1, expressa nas células endoteliais. Outro efeito, investigado neste projeto, é que células endoteliais bEnd.3 infectadas não apresentam diferença na taxa de proliferação celular.

Ja foi observado que *T. gondii* consegue infectar e se replicar em células endoteliais do compartimento vascular para invadir o SNC (KONHADT et al. 2016). A capacidade deste parasito em atravessar a BHE colabora para sua disseminação e patogênese. O endotélio permite a troca de O<sub>2</sub> do sangue para o cérebro e de CO<sub>2</sub> do cérebro para o sangue, além do transporte de ions e nutrientes do sistema sanguíneo, também o protege contra insultos tóxicos e patogênicos presentes na circulação (ABBOTT, 2005; BEN- ZVI et al., 2014).

Durante a infecção, há uma ruptura desta barreira, como demonstrado anteriormente, *in vivo*, por Estato e seus colaboradores (2018) justificada pela tendencia na redução da TEER , o que facilita a passagem do parasito para o parenquima cerebral (**Figura 6**). Ademais, recentemente foi descrito que a infecção de BMECs por *T. gondii* apresentaram resistência elétrica transendotelial diminuída, refletindo em danos na monocamada endotelial (AL.SANDAQCHI *et al.*, 2020). Em concordância com estes achados, a infecção por *T. gondii* diminuiu a TEER de células Caco-2 derivadas de adenocarcinoma colorretal, prejudicando a integridade da monocamada de células epiteliais intestinais pela ruptura das TJs (BRICEÑO *et al.*, 2016).

A estabilidade vascular da BHE conferida pelas BMECs, astrócitos e pericitos é essencial para garantir a integridade da BHE. Células endoteliais apresentam TJs e junções aderentes que atuam na adesão de células vizinhas, limitando a permeabilidade paracelular. As ligações físicas entre as estruturas juncionais são mediadas pelas proteínas  $\alpha$ ,  $\beta$ -catenina, ZO-1 e afadina, envolvendo várias etapas que se inicia pelas junções aderentes com posterior agrupamento de proteínas e organização estrutural em membranas celulares, culminando no recrutamento e montagem de maquinas juncionais. A eficacia das TJs parece estar relacionada a isoforma ZO-1 que liga as claudinas e ocludinas via cingulina aos filamentos de actina

do citoesqueleto, formando uma barreira paracelular nas BMECs, garantindo a integridade da BHE e conferindo alta permeabilidade (CEREJIDO *et al.*, 1998; LUISSINT *et al.*, 2012; MCDANNOLD *et al.*, 2012;; TIETZ; ENGELHARDT, 2015; WOLBURG *et al.*, 2009). Vários mecanismos moleculares são descritos acerca da expressão de proteínas da TJ como ZO-1, Claudina-5 e Ocludinas nas células endoteliais, levando a formação da BHE (Zhao *et al.* 2015). Ao corroborar com os dados de disfunção da BHE originada pela infecção por *T. gondii*, *in vivo* (Estato *et al.*, 2018), nossos dados apontam para o mecanismo molecular da patogenia da toxoplasmose.

Nesse contexto, a infecção por *T. gondii* pode interromper a expressão das TJs, indicado pela diminuição da imunorreatividade de ZO-1 (**Figura 7C**), gerando impacto direto na organização das células endoteliais, que também apresentaram redução durante a infecção, tornando a BHE permeável para a passagem de *T. gondii*, dentre outras moléculas tóxicas, íons e solutos para o microambiente cerebral.. Em paralelo a estes dados, nosso grupo demonstrou recentemente (Marcos *et al.*, 2020) que a infecção por *T. gondii* nas células da glia radial (progenitores neurais que se diferenciam em astrócitos, neurônios e microglia) apresentou impacto na permeabilidade de células endoteliais, demonstrado pela redução da TEER, da intensidade de fluorescência e na organização de ZO-1. No entanto, células endoteliais tratadas com o meio condicionado da glia radial não infectada, apresentaram aumento nas taxas de TEER, expressão e organização de ZO-1, indicando que a glia radial exibe um papel modulador de células endoteliais. O aumento da permeabilidade da monocamada celular frente a infecção pode estar relacionado ao processo de invasão de taquizoítos no parenquima cerebral ou induzido pela resposta imune.

A permeabilidade endotelial de BMECs também é alterada durante a infecção por Zika vírus, demonstrado pela redução dos níveis de expressão da proteína claudina-5 (LEDA *et al.*, 2019). Recentemente foi descrito que o tratamento de BMECs com a subunidade S1 da proteína spike de SARS-CoV-2 aumentou a permeabilidade celular e reduziu a intensidade de fluorescência de ZO-1, utilizando um modelo 3D da BHE, indicando quebra desta barreira (BUZHDIYGAN *et al.*, 2020).



Para completar a caracterização do perfil de células endoteliais, avaliamos o potencial de proliferação celular e vimos que a infecção por *T. gondii* não foi capaz de alterar, preliminarmente, o perfil de proliferação de células bEnd.3 (**Figura 8**). O ciclo celular das células de mamíferos é altamente regulado e complexo que culmina na divisão celular (GRAÑA; REDDY, 1995). Este parâmetro foi utilizado pois na literatura é descrito que o parasito diminui a proliferação de certos tipos celulares e leva à interrupção do ciclo celular do hospedeiro (BRUNET et al., 2008). Nosso grupo caracterizou o papel da infecção por *T. gondii* em culturas da glia radial e foi visto que a proliferação global não foi alterada e apenas progenitores neurais apresentaram diminuição na taxa de proliferação (MARCOS et al., 2020). No entanto, a infecção por *T. gondii* aumentou a taxa de proliferação de células musculares C2C12 (VIEIRA et al., 2019).

Os resultados apresentados neste trabalho apontam para os efeitos da infecção por *T. gondii* em BMECs. Estes efeitos podem estar relacionados com a patogenia da toxoplasmose a nível SNC, gerando manifestações clínicas como a microcefalia, malformações, cegueira, surdez e déficits cognitivos na toxoplasmose congênita ou em quadro de imunossupressão, tendo como a principal porta de entrada para o parênquima, a ruptura da BHE.

## 7. CONCLUSÕES

As principais contribuições apresentadas neste trabalho somadas aos anteriores do nosso grupo, colaboram para o melhor entendimento acerca da interação do *T. gondii* com células endoteliais da BHE. Vimos que a infecção leva a uma tendência na redução da TEER, bem como diminui os níveis de expressão e organização da proteína ZO-1, sem alterar a proliferação celular.

Ao comprometer a estabilidade e permeabilidade das BMECs formadoras da BHE, o processo do controle seletivo rigoroso de nutrientes para o parênquima será afetado, permitindo assim, a passagem de parasitos e outros insultos tóxicos para o parênquima cerebral.

Os resultados gerados neste trabalho contribuíram para a compreensão do mecanismo molecular da infecção por *T. gondii* no SNC, *in vitro*. Ainda faltam estudos para elucidar completamente o mecanismo do parasitismo no SNC que é capaz de causar diversas desordens no hospedeiro tanto na infecção crônica em indivíduos quanto na toxoplasmose congênita.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, N. J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. **Journal of Anatomy**, v. 200, p. 629–638, jun. 2002.
- ABBOTT, N. J. **Physiology and Pharmacology of the Blood–Brain Barrier: Comparative physiology of the blood–brain barrier**. Berlim: Springer, 1992. p. 371–396.
- ABBOTT, N. J.; PATABENDIGE, A. A. K.; DOLMAN, D. E. M.; YUSOF, S. R.; BEGLEY, D. J. Structure and function of the blood–brain barrier. **Neurobiology of Disease**, v. 37, p. 13–25, jan. 2010.
- ABBOTT, N.J. Evidence for bulkflow of brain interstitialfluid: significance for physiology and pathology. **Neurochemistry International**, v. 45, p. 545–552, set. 2004.
- ABBOTT, N.J.; RONNBACK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood–brain barrier. **Nature: Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 41–53, jan. 2006.
- AL-SANDAQCHI, A. T.; MARSH, V.; WILLIAMS, H. E. L.; STEVENSON, C. W.; ELSHEIKHA, H. M. Structural, Functional, and Metabolic Alterations in Human Cerebrovascular Endothelial Cells during *Toxoplasma gondii* Infection and Amelioration by Verapamil In Vitro. **Microorganisms**, v. 8, set. 2020.
- ANDREONE, B. J.; LACOSTE, B.; GU, C. Neuronal and vascular interactions. **Annual Review Neuroscience**, v. 38, p. 25–46, jul. 2015.
- ARMULIK, A., A.; ABRAMSSON, C.; BETSHOLTZ. Endothelial/Pericyte interactions. **Circulation Research**. v. 97, p. 512-523, set. 2005.
- ARMULIK, A., G.; GENOVÉ, C.; BETSHOLTZ. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. **Developmental Cell**, v. 21, p. 193-215, ago. 2011.

BAUER, H.C.; TRAWEGER, A.; BAUER, H. Proteins of the tight junction in the blood brain barrier. In: SHARMA, H.S.; WESTMAN, J. (Eds). **Blood–Spinal Cord and Brain Barriers in Health and Disease**. San Diego: Academic Press, 2004. p. 1–10.

BEGLEY D.J.; BRIGHTMAN M.W. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. **Progress in Drug Research**, v. 61. p. 39-78, 2003.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 607–623, set. 2000.

BLEAU, C.; FILLIOL, A.; SAMSON, M.; LAMONTAGNE, L. Brain Invasion by Mouse Hepatitis Virus Depends on Impairment of Tight Junctions and Beta Interferon Production in Brain Microvascular Endothelial Cells. **Journal of Virology**, v. 89, p. 9896–9908, jul. 2015.

BRICEÑO, M. P.; NASCIMENTO, L. A.; NOGUEIRA, N. P.; BARENCO, P. V.; FERRO, E. A.; REZENDE-OLIVEIRA, K.; GOULART, L. R.; ALVES, P. T.; BARBOSA, B.; LIMA, W. R.; SILVA, N. M. *Toxoplasma gondii* Infection Promotes Epithelial Barrier Dysfunction of Caco-2 Cells. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 64, p. 459–469. Ago. 2016.

BROWN, R. C.; MORRIS, A. P.; O'NEIL, R. G. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. **Brain Research**, v. 1130, p. 17–30, jan. 2007.

BRUNET, J.; PFAFF, A. W.; ABIDI, A.; UNOKI, M.; NAKAMURA, Y.; GUINARD, M.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI, E.; MOUSLI, M. *Toxoplasma gondii* exploits UHRF1 and induces host cell cycle arrest at G2 to enable its proliferation. **Cellular microbiology**, v. 10, p. 908–920, nov. 2008.

BUTT, H.-J.; WOLFF, E. K.; GOULD, S. A. C.; DIXON NORTHERN, B.; PETERSON, C. M.; HANSMA, P. K. Imaging cells with the atomic force microscope. **Journal of Structural Biology**, v. 105, p. 54–61, out. 1990.

BUZHDIYGAN, T. P.; DEORE, B. J.; BALDWIN-LECLAIR, A.; BULLOCK, T. A.; MCGARY, H. M.; KHAN, J. A.; RAZMPOUR, R.; HALE, J. F.; GALIE, P. A.; ALLISON, R. P.; ANDREWS; RAMIREZ, S. H. The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in-vitro models of the human blood–brain barrier. **Neurobiology of Disease**, v. 146, p. 105-131, dez. 2020.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections: a review. **Acta Tropica**, v. 121, n. 2, p. 55-70, fev. 2012.

CARME, B.; BISSUEL, F.; AJZENBERG, D.; BOUYNE, R.; AZNAR, C.; DEMAR, M.; BICHAT, S.; LOUVEL, D.; BOURBIGOT, A. M.; PENEAU, C.; NERON, P.; DARDÉ, M. L. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4037-4044, nov. 2002.

CARRUTHERS, V.B.; SUZUKI, Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. **Schizophr. Bull.**, v. 33, p. 745–751, 2007.

CEREJIDO, M.; VALDES, J.; SHOSHANI, L.; CONTRERAS, R. G. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. **Annual Review of Physiology**, v. 60, p. 161–177, mar. 1998.

CSERR, H.F.; BUNDGAARD, M. Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 246, p. 277-288, mar. 1984.

DANEMAN, R. The blood-brain barrier in health and disease. **Annals of Neurology**, v.72, p. 648-672, mai. 2012.

DANEMAN, R.; PRAT, A. The blood–brain barrier. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, jan. 2015. Disponível em: <https://cshperspectives.cshlp.org/content/7/1/a020412.short>. Acesso em: 10 jul. 2020.

DROZDOWICZ, Y. M.; SHAW, M.; NISHI, M.; STRIEPEN, B.; LWINSKI, H. A.; ROOS, D. S.; REA, P. A. Isolation and characterization of TgVP1, a type I vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase from *Toxoplasma gondii*. The dynamics of its subcellular localization and the cellular effects of a diphosphonate inhibitor. **Journal of Biology Chemistry**, v. 278, p. 1075– 1085, jan. 2003.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1019–1024, jul. 1998.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 57–72, dez. 2004.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in sheep—the last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 1–14, jul. 2009a.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press. 2010a. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=5Nm7t5p9APAC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Toxoplasmosis+of+Animals+and+Humans&ots=07Z2o814Mp&sig=xSsrXN9grssVr1hQ8rN-mp4DHrs#v=onepage&q=Toxoplasmosis%20of%20Animals%20and%20Humans&f=false>. Acesso em: 10 jul. 2020.

DUBEY, J. P.; FRENKEL J.K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **The Journal of Protozoology**, v. 23, p. 537–546, nov. 1976.

DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1257–1278, set. 2008.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, p. 1375–1424, set. 2012.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Review**, v.11, p. 267–299, abr. 1998.

ELSHEIKHA, H. M.; KHAN, N. A. Protozoa traversal of the blood-brain barrier to invade the central nervous system. **FEMS Microbiology Review**, v. 34, p. 532–553, 2010.

ESTATO, V.; STIPURSKY, J.; GOMES, F.; MERGENER, T. C.; FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; ALLODI, S.; TIBIRIÇA, E.; BARBOSA, H. S.; ADESSE, D. The neurotropic parasite *Toxoplasma gondii* induces sustained neuroinflammation with microvascular dysfunction in infected mice. **The American Journal of Pathology**, v. 188, p. 2674–2687, nov. 2018.

EUGENIN, E.A.; CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C.; BERMAN, J. W. Human Immunodeficiency Virus Infection of Human Astrocytes Disrupts Blood–Brain Barrier Integrity by a Gap Junction-Dependent Mechanism. **Journal of Neuroscience**, v. 31, p. 9456-9465, jun. 2011.

FERGUSON, D. J.; HUTCHISON, W. M.; SLIM, J. C. The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. **Acta Pathology and Microbiology**, v. 83, p. 491–505, 1975.

FERREIRA DA SILVA, M. F.; BARBOSA, H. S.; GROß, U.; LÜDER, C. G. K. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. **Molecular BioSystems**, v. 4, p. 824-834, jun. 2008.

FRENKEL, J. K. Pursuing toxoplasma. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 122, p. 553-559. Dez. 1970.

GRAÑA, X.; REDDY, E. P. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). **Oncogene**, v. 11, p. 211–219, 1995.

GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C.; MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **Journal Infectology Disease**, v. 184, p. 633–639, 2001.

GROSS, U.; BOHNE, W.; SOETE, M.; DUBREMETZ, J. F. Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Today**, v.12, p. 30–33, 1996.

GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: Dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 61-84, 2013.

GUMBINER, B.M. Breaking through the tight junction barrier. **The Journal of Cell Biology**, v. 123, p. 1631–1633, dez. 1993.

HAWKINS, B. T.; DAVIS, T. P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 173-185, jun. 2005.

HIRRLINGER, J.; DRINGEN, R. The cytosolic redox state of astrocytes: maintenance, regulation and functional implications for metabolite trafficking. **Brain Research Reviews**, v. 63, p. 177-188, mai. 2010.

HOLLY, J.; PERKS, C. The role of insulin-like growth factor binding proteins. **Neuroendocrinology**, v. 83, p. 154–160, out. 2006.

HOWE, D. K.; HONORÉ, S.; DEROUIN, F.; SIBLEY, L. D. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1411-1414, jun. 1997.

JESPERSEN, S. N.; ØSTERGAARD, L. The roles of cerebral blood flow, capillary transit time heterogeneity and oxygen tension in brain oxygenation and metabolism. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 32, p. 264–277, fev. 2012.

JONES, J. L.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital toxoplasmosis: a review. **Obstet Gynecology**, v. 56, p. 296–305, 2001a

KONRADT, C.; UENO, N.; CHRISTIAN, D.; DELONG, J. H.; PRITCHARD, G. H.; HERZ, J.; BZIK, D. J.; KOSHY, A. A.; MCGAVERN, D. B.; LODOEN, M. B.; HUNTE, C. A. Endothelial cells are a replicative niche for entry of *Toxoplasma gondii* to the central nervous system. **Nature Microbiology**, v. 1, fev. 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol20161>. Acesso em: 10 jul. 2020.

LACHENMAIER, S. M.; DELI, M. A.; MEISSNER, M.; LIESENFELD, O. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood–brain barrier. **Journal of Neuroimmunology**, v. 232, p. 119–130, mar. 2011.

LEDA, A. R.; BERTRAND, L.; ANDRAS, I. E.; EL-HAGE, N.; NAIR, M.; TOBOREK, M. Selective Disruption of the Blood-Brain Barrier by Zika Virus. **Frontiers in microbiology**, v. 10, 2019.

LÜDER, C. G. K.; GIRALDO-VELÁSQUEZ, M.; SENDTNER, M.; GROSS, U. *Toxoplasma gondii* in Primary Rat CNS Cells: Differential Contribution of Neurons,



Astrocytes, and Microglial Cells for the Intracerebral Development and Stage Differentiation. **Experimental Parasitology**, v. 93, p. 23–32, set. 1999.

LUISSINT, A.-C.; ARTUS, C.; GLACIAL, F.; GANESHAMOORTHY, K.; COURAUD, P.-O. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 9, p. 23-34, nov. 2012.

LUSTIG, S.; DANENBERG H. D.; KAFRI, Y.; KOBILER, D.; BEN-NATHAN, D. Viral neuroinvasion and encephalitis induced by lipopolysaccharide and its mediators. **Journal of Experimental Medicine**, v. 176, p. 707–712, set. 1992.

MAENZ, M.; SCHLÜTER, D.; LIESENFELD, O.; SCHARES, G.; GROSS, U.; PLEYER, U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 39, p. 77–106, 2014.

MARCOS, A. C., SIQUEIRA, M., ALVAREZ-ROSA, L., CASCABULHO, C. M., WAGHABI, M. C., BARBOSA, H. S., ADESSE, D., STIPURSKY, J. Toxoplasma gondii infection impairs Radial glia differentiation and its potential to modulate brain microvascular endothelial cell function in the cerebral cortex. **Microvascular Research**, v. 131, set. 2020.

MAYER, F.; MAYER, N.; CHINN, L.; PINSONNEAULT, R. L.; KROETZ, D.; BAINTON, R. J. Evolutionary conservation of vertebrate blood–brain barrier chemoprotective mechanisms in Drosophila. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 3538-3550, mar. 2009.

MCDANNOLD, N.; ARVANITIS, C. D.; VYKHODTSEVA, N; LIVINGSTONE, M. S. Temporary disruption of the blood–brain barrier by use of ultrasound and microbubbles: safety and efficacy evaluation in rhesus macaques. **Cancer Research**, v. 72, p. 3652-3663, jun. 2012.

MELZER, T. C.; CRANSTON, H. J.; WEISS, L. M.; HALONEN, S. K. Host Cell Preference of Toxoplasma gondii Cysts in Murine Brain: A Confocal Study. **Journal of neuroparasitology**, v. 1, mai. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3103221/>. Acesso em: 10 jul. 2020.

MITIC, L. L.; VAN ITALLIE, C. M.; ANDERSON, J. M. Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions I. Tight junction structure and function: lessons

from mutant animals and proteins. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, p. 250–254, ago. 2000.

MOURA, M. A.; AMENDOEIRA, M. R. R.; BARBOSA, H. S. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 6, p. 862-864, Set. 2009.

NEUWELT, E. A.; BAUER, B.; FAHLKE, C.; FRICKER, G.; IADECOLA, C.; JANIGRO, D.; LEYBAERT, L.; MOLNÁR, Z.; O'DONNELL, M. E.; POVLISHOCK, J. T.; SAUNDERS, N. R.; SHARP, F.; STANIMIROVIC, D.; WATTS, R. J.; DREWES, L. R. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, p. 169-182, mar. 2011.

OMIDI, Y.; CAMPBELL, L.; BARAR, J.; CONNELL, D.; AKHTAR, S.; GUMBLETON, M. Evaluation of the immortalised mousebrain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood–brain barrier model for drug uptake transport studies. **Brain Research**, v. 990, p. 95–112, nov. 2003.

PARDRIDGE, W. M.; BOADO, R. J.; FARRELL, C. R. Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 18035–18040, out. 1990.

PYTEL, P. A.; ALEXANDER, J. J. A. Pathogenesis of septic encephalopathy. **Current Opinion in Neurology**, v. 22, p. 283-287, jun. 2009.

REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J. O. (Eds.), **Infectious Diseases of the Fetus and the New born**. Philadelphia: Elsevier Inc, ed. 5, 2001, p. 205–346.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Review**, v. 25, p. 264-296, 2012.

SANDOVAL, K. E.; WITT, K. A. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. **Neurobiology of Disease**, v. 32, p. 200–219, nov. 2008.

SHAW, M. K.; ROOS, D. S.; TILNEY, L. G. Acidic compartments and rhoptry formation in *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 117, p. 435-43, nov. 1998.

SIQUEIRA, M.; FRANCIS, D.; GISBERT, D.; GOMES, F.C.A.; STIPURSKY, J. Radial glia cells control angiogenesis in the developing cerebral cortex through TGF- $\beta$ 1 signaling. **Molecular Neurobiology**, v. 55, p. 3660-3675, mai, 2018.

SIBLEY, L. D.; AJIOKA, J. W. Population Structure of *Toxoplasma gondii*: Clonal Expansion Driven by Infrequent Recombination and Selective Sweeps. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 329–351, 2008.

SPINDLER, K. R.; HSU, T. H. Viral disruption of the blood-brain barrier. **Trends in Microbiology**, v. 20, p. 282–290, jun. 2012.

SRINIVASAN, B.; KOLLI, A. R.; ESCH, M. B.; ABACI, H. E.; SHULER, M. L.; HICKMAN, J. J. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. **Journal of Laboratory Automation**, v. 20, p. 107–126, 2015.

SUKITA, S.; FURUSE, M.; ITOH, M. Multifunctional strands in tight junctions. **Nature Review: Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 285–293, abr. 2001.

SUZUKI, Y.; CLAFLIN, J.; WANG, X.; LENGI, A.; KIKUCHI, T. Microglia and macrophages as innate producers of interferon-gamma in the brain following infection with *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 83–90, jan. 2005.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, p. 1217–1258, nov. 2000.

TERRYN, C.; SELLAMI, M.; FICHEL, C.; DIEBOLD, M.-D.; GANGLOFF, S.; LE NAOUR, R.; ZAHM, J.-M. Rapid method of quantification of tight-junction organization using image analysis. **Cytometry: Part A**, v. 83A, p. 235–241, dez. 2012.

TIETZ, S.; ENGELHARDT, B. Brain barriers: crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. **Journal of Cell Biology**, v. 209, p. 493–506, mai. 2015.

VIEIRA, P. C.; WAGHABI, M. C.; BEGHINI, D. G.; PREDES, D.; ABREU, J. G.; MOULY, V.; BUTLER-BROWNE, G.; BARBOSA, H. S.; ADESSE, D. *Toxoplasma gondii* Impairs Myogenesis *in vitro*, With Changes in Myogenic Regulatory Factors, Altered Host Cell Proliferation and Secretory Profile. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, 2019.

WOLBURG, H.; LIPPOLDT, A. Tight junctions of the blood–brain barrier: development, composition and regulation. **Vascular Pharmacology**, v. 38, p. 323–337, jun. 2002.

WOLBURG, H.; NOELL, S.; MACK, A.; WOLBURG-BUCHHOLZ, K.; FALLIER-BECKER, P. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. **Cell and Tissue Research**, v. 335, p. 75–96, jan. 2009.

WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**, v. 7, p. 299–316, 1993.

WEISS, N.; MILLER, F.; CAZAUBON, S.; COURAUD, P. O. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. **Biochimica et Biophysica**, p. 842–857, dez. 2008

XIAO, G.; GAN, L. S. Receptor-mediated endocytosis and brain delivery of therapeutic biologics. **International Journal of Cell Biology**, v. 2013, jun. 2013. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijcb/2013/703545/>. Acesso em: 10 jul. 2020.

ZHOU, Y.; PENG, Z.; SEVEN, E. S.; LEBLANC, R. M. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 270, p. 290–303, jan. 2018.