



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Estudo da eficiência da replicação *in vitro* do parasita intracelular *Toxoplasma gondii* em esferoides formados por nanopartículas paramagnéticas produzidas por radiação ionizante

ANA CRISTINA GOMES NASCIMENTO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador:
Prof. Dr. Daniel Perez Vieira

São Paulo
2022

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Estudo da eficiência da replicação *in vitro* do parasita intracelular *Toxoplasma gondii* em esferoides formados por nanopartículas paramagnéticas produzidas por radiação ionizante

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

ANA CRISTINA GOMES NASCIMENTO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

**Orientador:
Prof. Dr. Daniel Perez Vieira**

**São Paulo
2022**

Fonte de Financiamento: Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN)

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

GOMES NASCIMENTO, A. C. . ***Estudo da eficiência da replicação in vitro do parasita intracelular Toxoplasma gondii em esferoides formados por nanopartículas paramagnéticas produzidas por radiação ionizante.*** 2022. 74 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gomes Nascimento, Ana Cristina Estudo da eficiência da replicação in vitro do parasita intracelular Toxoplasma gondii em esferoides formados por nanopartículas paramagnéticas produzidas por radiação ionizante / Ana Cristina Gomes Nascimento; orientador Daniel Perez Vieira. -- São Paulo, 2022.

74 f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2022.

1. Toxoplasma gondii. 2. Cultura de células tridimensionais. 3. Nanopartículas . 4. Radiação Ionizante. 5. Replicação in vitro do parasita . I. Perez Vieira, Daniel , orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Ana Cristina Gomes Nascimento

Título: Estudo da eficiência da replicação *in vitro* do parasita intracelular *Toxoplasma gondii* em esferoides formados por nanopartículas paramagnéticas produzidas por radiação ionizante

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em tecnologia nuclear da universidade de São Paulo para obtenção de título de mestre em ciências.

Data: 22/03/2022

Banca examinadora

Prof. Dr.: Daniel Perez Vieira

Instituição: IPEN

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: Andrés Jimenez Galisteo Jr.

Instituição: FMUSP

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: Alex Martins Nasaré

Instituição: Unifesp

Julgamento: Aprovado

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que estudam doenças negligenciadas, por fazerem a diferença na sociedade e na saúde pública. Espero que essa pesquisa os ajude de alguma forma a entender, e quem sabe, a melhorar o prognóstico dos pacientes com Toxoplasmose.

*Ao paciente que atendi no plantão em ressonância magnética que possuía inúmeros cistos de *Toxoplasma gondii* no cérebro, por ter me motivado todos os dias a dar o meu melhor.*

A Maria Betania e a Amanda que me deram o essencial para um ser humano se desenvolver, o amor. Dedico esse trabalho a essas duas mulheres incríveis que fizeram quem eu sou hoje.

Ao Pedro Henrique por ser um bom companheiro e por me fazer ver sempre o lado bom da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus minha infinita gratidão.

Ao meu orientador Dr. Daniel Perez Vieira pela oportunidade, pela paciência, pelas conversas enriquecedoras e por acreditar em mim.

*Agradeço a equipe de protozoologia do IMT em especial ao Dr. Andrés Galisteo Jr. pelos ensinamentos sobre *Toxoplasma gondii* mas acima de tudo por suportar a minha teimosia e inexperiência. Agradeço também a Dra. Luciana Meireles, sem a sua colaboração o trabalho não seria possível.*

Agradeço a Cleusa Takakura técnica responsável pela microscopia eletrônica de transmissão do FMUSP. Agradeço por me ensinar e pelas horas dedicadas ao projeto, você fará muita falta na ciência.

Agradeço ao centro de pesquisa CEBIO do IPEN, pelo apoio e estrutura. Ao grupo de Radiobiologia, o meu muito obrigada, meus dias foram mais felizes com a companhia de vocês. Aos amigos, pois com eles a vida fica mais leve.

Agradeço a Letícia Bonfim e a Priscila Passos por desenvolverem as nanopartículas de ferro. Além disso agradeço pela amizade e por serem um exemplo para mim. A Mayelle, a Giovana e o Leonardo que fizeram parte dos meus dias e ressignificaram o trabalho em equipe em meio a pandemia.

Agradeço a minha mãe Maria Betania e minha irmã Amanda vocês são a base de tudo. Esse trabalho é para vocês e por vocês.

Ao meu esposo Pedro Henrique pelo seu amor, cuidado, carinho, apoio, companheirismo, por acreditar, por sonhar e por viver esse sonho comigo.

Os meus sogros Ana Maria e Nivaldo que ao se tornarem da minha família me apoiaram em tudo. A Thais por entender minha ansiedade.

À CNEN pelo apoio financeiro desta pesquisa.

À Alexandra Elbakyan, fundadora do banco de artigos Sci-Hub, sem o qual não teríamos acesso à todo o conhecimento científico necessário para a conclusão deste trabalho.

“Nós, os novos, sem nome, de difícil compreensão, nós, percursores de um futuro incerto, nós necessitamos, para um novo fim, também de um novo meio, ou seja, de uma nova saúde, mais forte [...] para isso necessita mais e antes de tudo uma coisa, a grande saúde – aquela que não apenas se tem, mas constantemente se adquire e é preciso adquirir, pois sempre de novo se abandona e é preciso abandonar”.

(Friedrich Nietzsche, A Gaia Ciência - 382)

RESUMO

NASCIMENTO, ANA C.G. **Estudo da eficiência da replicação *in vitro* do parasita intracelular *Toxoplasma gondii* em esferoides formados por nanopartículas paramagnéticas produzidas por radiação ionizante.** 2022. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Toxoplasma gondii é um protozoário capaz de infectar uma ampla gama de seres vivos, dentre eles os felinos que são os hospedeiros definitivos da doença, toxoplasmose, e animais de pecuárias e aves. Em humanos o parasita também pode se apresenta de forma latente ou cística, a última podendo tornar-se crônica, fazendo com que o parasita possa se alojar no cérebro, retina ou músculos. A infecção ocorre pelo consumo de água ou alimentos contaminados com esporozoítos ou com cistos contendo bradizoítos encontrados em carne crua. Os taquizoítos da cepa RH possuem rápida replicação e relativa dificuldade de manutenção *in vitro*, frequentemente requerendo estágios de cultivo *in vivo* em animais experimentais. O uso da nanotecnologia pode contribuir para tipos de produção *in vitro* com potenciais ganhos de praticidade e rendimento, por meio do cultivo tridimensional de células de fibroblastos de camundongo e nanopartículas sintetizadas com radiação ionizante. O objetivo deste trabalho foi demonstrar a cultura tridimensional de fibroblastos agregados a nanopartículas para inoculação do *T. gondii* com a intenção de facilitar o manejo e a replicação *in vitro* do parasita. Nanopartículas de magnetita foram produzidas a partir da redução de sulfato ferro heptahidratado em pH altamente alcalino sob a ação das ionizações produzidas por feixe de elétrons entre 15 e 30kGy. As nanopartículas paramagnéticas foram adicionadas a cultura de células, que formaram uma interface ar-líquido através do campo magnético. Cada esferoide foi infectado por taquizoítos da cepa RH e mantidos em cultura para avaliação por microscopia eletrônica de transmissão e por microscopia de fluorescência com renderização em 3D. A presença do parasita foi confirmada por PCR e a quantidade de parasitas livres em cultura foi avaliada por citometria de fluxo. O modelo de cultivo tridimensional utilizado mostrou produção sustentável de taquizoítos em até 24 horas após ao inóculo, mostrando-se como um potencial substitutivo do uso de animais para manutenção do parasita.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, Cultura de células tridimensionais, Nanopartículas.

ABSTRACT

NASCIMENTO, ANA C.G. **Study of the efficiency replication of the *in vitro* intracellular parasite *Toxoplasma gondii* in spheroids formed by paramagnetic nanoparticles produced by ionizing radiation.** 2022. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite capable of infecting a wide range of living beings, including felines that are the definitive hosts of the disease, toxoplasmosis, and livestock, birds and fish. In humans, the parasite can also be present in a latent or cystic form, the latter being able to become chronic, causing the parasite to lodge in the brain, retina or muscles. Infection occurs by consumption of water or food contaminated with sporozoites or cysts containing bradyzoites found in raw meat. The tachyzoites of RH strain have rapid replication and relative difficulty of maintenance exclusively *in vitro*, often requiring stages of *in vivo* cultivation in experimental animals. The use of nanotechnology can be helpful to build new forms of *in vitro* production with potential gains in practicality and yield, through the three-dimensional culture of mouse fibroblast cells and nanoparticles synthesized with ionizing radiation. The objective of this work was to demonstrate the three-dimensional culture of fibroblasts aggregated to nanoparticles for inoculation of *T. gondii* with the intention of facilitating the management and *in vitro* replication of the parasite. Magnetite nanoparticles were produced from the reduction of iron sulfate heptahydrate in highly alkaline pH under the action of ionization produced by electron beam between 15 and 30kGy. Paramagnetic nanoparticles were added to cell cultures, which formed an air-liquid interface through the magnetic field. Each spheroid was infected with tachyzoites of the RH strain and maintained in culture for evaluation by transmission electron microscopy and fluorescence microscopy with 3D rendering. The presence of the parasite was confirmed by PCR and the number of free parasites in culture was evaluated by flow cytometry. The three-dimensional culture model used showed sustainable production of tachyzoites within 24 hours after inoculum, showing itself as a potential surrogate for the use of animals for the maintenance of the parasite.

Key word: *Toxoplasma gondii*, Three-dimensional cell culture, Nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	<i>Toxoplasma gondii</i> e o seu ciclo de vida (DUBEY; LINDSAY, 1998)	19
Figura 2:	Aspecto geral dos esferoides. A: Placa repelente a células contendo 96 esferoides de C2C12. B: Aspecto típico de esferoides de C2C12. Aumento: 10X	20
Figura 3:	Figura 3: A – Representação esquemática assinalando as principais organelas e estruturas conforme observações em microscopia eletrônica de transmissão. B – Microscopia eletrônica de transmissão de uma forma taquizoíta de <i>Toxoplasma gondii</i> . Neste corte longitudinal podem ser observadas várias das estruturas representadas em A: N (núcleo), c (conóide), R (roptrias), A (apicoplasto), CG (<i>complexo de Golgi</i>), g (grânulo denso), seta (micronema), VP (vacúolo parasitóforo). Barra de 1 µm (ATTIAS et al., 2014).	27
Figura 4:	Estratégia de gates utilizados para avaliação das quantidades de taquizoítos de <i>T. gondii</i> nos cultivos celulares. A - <i>Beads</i> : região em SSC-A x FSC-A que continha as microesferas de látex; B - <i>Singlets</i> : região em FSC-H x Largura que continha os eventos únicos, excetuando-se os eventos duplos; C - <i>Time gate</i> : Região em FSC-A x Tempo de aquisição, desconsiderando-se eventuais variações na velocidade de aquisição; D e E - Regiões em SSC-A x FL1 e FSC-A x FL1 que correspondiam a parâmetros de tamanho e complexidade compatíveis com os parasitas; F e G - População de eventos devidamente analisadas e representativas de taquizoítos de <i>T. gondii</i> contidas em gráficos <i>dot plot</i> (F) ou histograma (G).	34
Figura 5:	Esferoides de células C2C12 produzidos por levitação magnética em placas de 6 poços. Setas: esferoides. Linha pontilhada: diâmetro do poço: 34,8mm (dados do fabricante).	36
Figura 6:	Estado geral de esferoides de células C2C12 produzidos por levitação magnética em placas de 6 poços. (A): visualização em luz branca. (B) excitação por fonte violeta, evidenciando todos os núcleos marcados com Hoechst 33242. (C) excitação por fonte verde, evidenciando apenas os núcleos de células inviáveis. (d) sobreposição das imagens em (B) e (C). Aumento: 20x. Barra: 200µm.	37
Figura 7:	(A) Aspecto típico de um esferoide de C2C12 após 96 horas em cultura. Aumento: 10X. Barra: 100µm. (B) taquizoítos de <i>T.gondii</i> na região externa de um esferoide de C2C12 (sombra em semicírculo). Aumento: 40X. Barra: 25µm	38
Figura 8:	Estado geral de esferoides de células C2C12 produzidos por levitação magnética em placas de 6 poços e inoculados com 0 (A), 10 ³ (B), 1,6x10 ⁴ (C) e 3,2x10 ⁴ (D) taquizoítos de <i>T. gondii</i> . Aumento: 20X.	39
Figura 9:	Gel de agarose contendo arrastes de DNA e quatro bandas na região de interesse 286bp. Marcador de tamanho (100 pb). (1) esferoide infectado com 1x10 ⁴ taquizoítos; (2) Lavado peritoneal contendo 1x10 ⁴ taquizoítos, de controle positivo; (3) esferoide de célula de C2C12, de controle negativo; (4) H ₂ O como branco da amostra. As amostras a seguir foram feitas com a MIX 2 (5) esferoide infectado com 1x10 ⁴ taquizoítos; (6) Lavado peritoneal contendo 1x10 ⁴ taquizoítos, de controle positivo; (7) esferoide de célula de C2C12, de controle negativo	40
Figura 10:	Medida de viabilidade celular de culturas de C2C12 expostas a concentrações de nanopartículas (em função da concentração de Fe em mM). CC: controle de células (-) NaCl 0,09% em meio de cultura. (+) extrato de látex (0,5g/mL). (****): p<0,0001 (em relação ao controle CC). Barras: médias dos erro-padrão.	41
Figura 11:	Esferoides de células C2C12 produzidos por levitação magnética observados por microscopia eletrônica de transmissão. (A) e (B): Aumento 15000X.(C) e (D): Aumento 6200X. Setas: agregados de nanopartículas de magnetita. Divisas: núcleos.	42
Figura 12:	Achados ultraestruturais observados em esferoides de C2C12 infectados com taquizoítos de <i>T. gondii</i> . Divisas: estruturas com morfologia compatível à de vacúolos parasitóforos.	43

	Aumentos: (A): 8900X; (B): 12500X; (C) e (D): 17500X; (E) e (F): 30000X.	
Figura 13:	Esferoides de células NIH/3T3 produzidos por levitação magnética observados por microscopia eletrônica de transmissão. Aumentos: (A): 5000X; (B): 8000X; (C): 12000X; (D): 15000X. Setas: agregados de nanopartículas de magnetita. Divisas: núcleos.	47
Figura 14:	Achados ultraestruturais observados em esferoides de 3T3 infectados com taquizoitos de <i>T. gondii</i> . Setas pretas: agregados intracelulares de nanopartículas de magnetita. (t): morfologia compatível com a de um taquizoito intracelular de <i>T.gondii</i> . (a): estrutura morfológicamente identificada como complexo apical de taquizoito. (c): estrutura morfológicamente identificada como conóide de taquizoito. (v): estrutura morfológicamente identificada como vacúolo parasitóforo. (n) núcleo do taquizoito. (r): estrutura morfológicamente identificada como roptria. Seta branca: estrutura morfológicamente identificada como vacúolo parasitóforo com aparência similar à de achados em esferoides células C2C12. Divisas: estruturas com morfologia compatível à de vacúolos parasitóforos. Detalhe do taquizoito em (B) foi visualizado em maior aumento em (F). Aumentos: (A) e (B): 20000X; (C) e (D): 25000X; (E): 30000X; (F), (G) e (H): 40000X.	49-50
Figura 15:	Populações de taquizoitos marcados com Rodamina 123 e das <i>beads</i> adquiridas. A figura mostra as populações não marcadas ("branco") e marcadas após 0, 24, 48 ou 72 horas após inóculo nos esferoides. Colunas esquerda e central: populações de taquizoitos adquiridas e mostradas em <i>dot plots</i> ou em histogramas, respectivamente. Coluna direita: populações de <i>beads</i> adquiridas.	52
Figura 16:	A – Histograma mostrando as populações de taquizoitos de <i>T. gondii</i> adquiridas pelo equipamento após incubações por 0 (vermelho), 24 (verde), 48 (azul) e 72 (magenta) horas com os esferoides de fibroblastos. O histograma em preto representa amostra controle de taquizoitos viáveis mas não-marcada por Rodamina 123. B – populações de <i>beads</i> seguindo o mesmo código de cores. C – gráfico em barras mostrando as quantidades de taquizoitos (barras brancas; eixo esquerdo) e a proporção entre taquizoitos e <i>beads</i> (T/B, barras cinzas, eixo direito). Barras de erro: média do erro padrão. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle (0h de incubação). (*): $p < 0,05$. (****): $p < 0,0001$. D - tabela com os valores obtidos nas aquisições	54
Figura 17:	Esferoides de NIH/3T3 inoculados com taquizoitos de <i>T. gondii</i> e avaliados por microscopia de fluorescência 30 (A) ou 60 minutos (B) após inóculo. Azul: núcleos das células marcados com Hoechst 332412. Verde: taquizoitos de <i>T. gondii</i> marcados com Rodamina 123A, destacados por setas brancas. Aumento: 10X (destaque: 24X, digital). Barras: 100µm.	54
Figura 18:	Esferoides de NIH/3T3 inoculados com taquizoitos de <i>T. gondii</i> e avaliados por microscopia de fluorescência 0,5, 2, 4 e 24 horas após inóculo. Azul: núcleos das células marcados com Hoechst 332412. Vermelho: taquizoitos de <i>T. gondii</i> marcados com Rodamina 123A. Aumento: 10X. Barra: 100µm.	56
Figura 19:	Esferoide de NIH/3T3 inoculados com taquizoitos de <i>T. gondii</i> e avaliado por microscopia de fluorescência 24 horas após inóculo. Azul: núcleos das células marcados com Hoechst 332412. Vermelho: taquizoitos de <i>T. gondii</i> marcados com Rodamina 123A. Aumentos - Acima: 10X; Abaixo: 30X (digital). Barra: 33 µm.	58
Figura 20:	Eventos positivos para rodamina 123 no esferóide 24 horas após a infecção. Esquerda: Esferoides inteiro e quatro regiões de interesse destacadas contendo eventos relevantes. Ampliação: 4X. Barra de escala (branca): 200µm. (1), (2), (3) e (4): Zoom digital (16X) das regiões destacadas e suas respectivas vistas ortogonais (YZ e XZ). Barras de escala: 50µm (magenta) e 5µm (vermelho). Eventos pseudocoloridos: azul – núcleos NIH/3T3 (Hoechst 33342); verde – taquizoitos de <i>T. gondii</i> (Rodamine 123).	62
Figura 21:	A proporção de núcleo de célula por taquizoitos foi correlacionada com o tempo de infecção que demonstrou queda após 4 horas.	63

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

T. gondii - *Toxoplasma gondii*

RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute

DMSO -Dimetilsulfóxido

μL - microlitro

μg - micrograma

μm - micrometro

mM - milimolar

2D- bidimensional

3D - tridimensional

RM – Ressonancia Magnética

PION'S - nanopartículas paramagnéticas de óxido de ferro

PBS - solução salina tamponada com fosfato

SFB- Soro Fetal Bovino

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

PCR - reação em cadeia da polimerase

MTS - (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)

PMS- metanosulfato de fenazina

EDTA-ácido etilenodiamino tetra-acético

CC- Controle Celular

PV - Vacúolo parasitóforo

MET- Microscopia Eletronica de Transmissão

AGs – Ácidos graxos

GLs- Gotículas Lipídicas

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	<i>Nanopartículas sintetizadas por radiação ionizante</i>	15
1.2	<i>Toxoplasma gondii</i>	16
1.3	<i>Cultivo parasitário</i>	21
2.	OBJETIVOS	24
2.1	<i>Objetivo geral</i>	24
2.2	<i>Objetivos específicos</i>	24
3.	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	<i>Culturas de Células</i>	25
4.2	<i>Produções de nanopartículas paramagnéticas para o cultivo por levitação magnética</i>	25
4.3	<i>Esferoides</i>	26
4.4	<i>Ensaio de citotoxicidade</i>	27
4.5	<i>Parasitas</i>	28
4.6	<i>Ensaio de Microscopia Eletrônica de Transmissão</i>	28
4.7	<i>Microscopia de Fluorescência para teste de estabilidade do esferoide.</i>	29
4.8	<i>Reação em cadeia da Polimerase (PCR)</i>	30
4.9	<i>Análise de micrografias (INCell Analyzer)</i>	30
5.0	<i>Citometria de Fluxo</i>	32
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1	<i>Nanopartículas produzidas por radiação ionizante e formação esferoides celulares</i>	36
6.2	<i>PCR convencional de esferoides infectado com Toxoplasma gondii</i>	40
6.3	<i>Avaliação das Nanopartículas de Fe₃O₄ no ensaio de citotoxicidade</i>	41
6.4	<i>Taquizoítos de T. gondii por microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i>	42
6.5	<i>Avaliação da reprodução taquizoítos em esferoides de células NIH/3T3 por citometria de fluxo</i>	51
6.6	<i>Detecção de taquizoítos por análise de microscopia</i>	55
7.	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 Nanopartículas sintetizadas por radiação ionizante

A radiação é uma energia que se propaga através da matéria e do espaço. Existem duas formas de radiação, as oriundas de partículas (alfa, beta, nêutron) e as provenientes de ondas eletromagnéticas (ondas de rádio, micro-ondas, infravermelho, luz visível, ultravioleta, raios x e radiação gama). Quando a radiação está energeticamente excitada, com capacidade de mover um elétron da camada de valência, é chamada de radiação ionizante. Assim como os elétrons dos átomos, as moléculas dos materiais também podem sofrer ionização. Em 1895, Wilhelm Röntgen após perceber os possíveis efeitos da radiação, começou a pesquisar sobre as medidas de proteção que permitiu utilizar as radiações na medicina, indústria e para o uso em energia (DEWJI, 2021).

As nanopartículas são formas de organização dos materiais que possuem propriedades únicas originadas de seu pequeno tamanho ou alta área de superfície específica, o que lhes conferem ampla gama de aplicações como engenharia, gerenciamento de rejeitos, itens esportivos, eletrônicos, ótica, roupas, alimentos, cosméticos e medicina. Os benefícios das sínteses, o fácil manejo e a capacidade de observar os materiais em escala nanométrica são de alto impacto no estudo dos nanomateriais (CONTERA et al., 2021).

“Novos poderes para alcançar a nanoescala nos trouxeram a possibilidade sem precedentes de visar diretamente na escala das interações biomoleculares e a motivação para criar nanoestruturas inteligentes que pudessem contornar os obstáculos que impedem o sucesso das abordagens tradicionais” (CONTERA et al., 2021).

A utilização da radiação ionizante para sintetizar materiais inorgânicos tem relevância na literatura (ČUBOVÁ; ČUBA, 2020). As nanopartículas de óxido de ferro possuem uma elevada área superficial específica o que faz reduzir sua energia superficial, tornando-o mais suscetível a agregação. Esse efeito impacta negativamente na estabilidade das nanopartículas, e por esta razão é necessário

escolher uma síntese que não altere suas propriedades. As sínteses mais usuais são co-precipitação, impregnação e deposição-precipitação, mas recentemente tem se utilizado as sínteses verdes que são metodologias que geram rejeitos de toxicidade baixa e com baixo custo energético. Os benefícios das sínteses verdes ocorrem devido as técnicas empregadas, como plasma, micro-ondas, laser e ultrasonicação que permitem um maior controle do tamanho, morfologia e reprodutibilidade em grande escala, mediante o uso de precursores com baixa toxicidade e solventes não tóxicos. Além disso, esse processo diminui muito a geração de resíduos tóxicos. Nesse escopo, a radiação contribuiu significativamente para o progresso da área. Ao interagir com soluções aquosas, agentes redutores e oxidantes em toda amostra. O ambiente em que essa interação ocorre é capaz de gerar muitos agentes redutores. Os íons metálicos podem ter o seu estado oxidativo diminuído, em temperatura e pressão controlada. A irradiação gama é uma tecnologia madura e tem sido amplamente utilizada em vários campos, desde a indústria farmacêutica até a engenharia de materiais. Esta técnica representa uma abordagem revolucionária e limpa para a síntese controlada de nanomateriais (CLIFFORD et al., 2017).

A nanopartícula sob a influência do campo magnético dos ímãs é o que permite a agregação da suspensão celular, para que isso ocorra é necessário que a partícula esteja paramagnética, esse feito é obtido mediante o uso de radiação ionizante. A redução da síntese por radiação ionizante tem inúmeras vantagens em comparação aos métodos químicos usuais, pois independem de temperatura, não requer controle da condição experimental e produzem material de alta pureza. O método de radiação para a síntese de nanopartículas é ideal, pois os raios gamas e elétrons funcionam como precursores do processo de síntese em solução aquosa (ČUBOVÁ; ČUBA, 2020).

1.2 *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é um protozoário intracelular obrigatório que infecta animais homeotérmicos, sendo a infecção por parasita a mais comum em humanos. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com *T. gondii* (NAYERI et al., 2021). O principal modo de infecção é pela ingestão de

água e alimentos contaminados, pela forma oocística do parasita e o segundo modo é pelo consumo de carne mal cozida ou mal processada, contendo cistos teciduais, que uma vez no trato digestivo se diferenciam em taquizoítos. Com isso, eles invadem a célula hospedeira e após multiplicação, lisam as células para adentrarem em outras. O parasita pode persistir por toda vida do hospedeiro de forma latente encistado em células onde a resposta imunológica é mais fraca como: células musculares, neurais e retiniais (DESMETTRE, 2020). Não há vias de transmissão humano-humano descritas, exceto em casos de transmissão congênita e transplante de órgãos (ZHOU et al., 2021).

A infecção crônica do *T. gondii* é estudada utilizando modelos de roedores, cultura de células e dados clínicos, mas ainda existem lacunas onde faltam compreensão, por exemplo, os genes que controlam o desenvolvimento do parasita, os mecanismos de imunidade do hospedeiro infectado e os efeitos a longo prazo da infecção, são grupos de entidades biológicas ainda não completamente elucidados e que requerem mais estudos. Pesquisas ainda em desenvolvimento relacionam moléstias a toxoplasmose como doenças oculares, a inflamação do sistema nervoso central (SNC) e recentemente a doença de Alzheimer (NAYERI et al., 2021; ZHAO, X. Y.; EWALD, 2020). Os casos de abortos espontâneos por *Toxoplasma gondii*, tem sido alvo de atenção na área clínica demonstrando necessidade de aprimoramento nas pesquisas (AHMED et al., 2020).

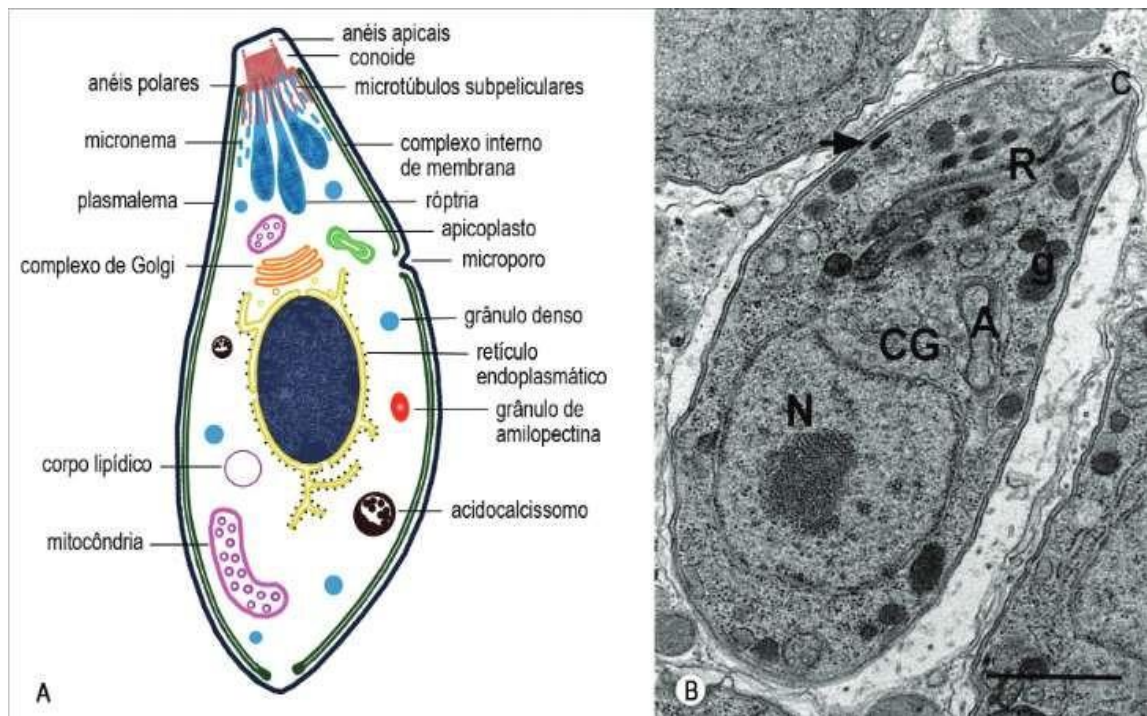
O *Toxoplasma gondii* é um parasita bem sucedido na evolução biológica pois tem uma ampla gama de hospedeiros, onde se reproduz de forma assexuada, realizando a conversão do estágio proliferativo de taquizoíto em bradizoíto quiescente, mediante a resposta imunológica do hospedeiro. Outra forma de reprodução é a sexual que ocorre no intestino do hospedeiro definitivo, que pertencem a família *Felidae*. O parasita preocupa a pecuária pela sua capacidade de causar abortos em rebanhos, levando a prejuízos econômicos. Em humanos, imunodeprimidos são os de toxoplasmose congênita, que pode levar à hidrocefalia, microcefalia e ao aborto. Em 1940 foi criado o teste sorológico Sabin-Feldman, o primeiro teste capaz de localizar anticorpos em um ser vivo. As taxas de infecção humana por *T. gondii* variam de 10% nos Estados Unidos a mais de 50% na França, Colômbia e Brasil (ZHAO, X. Y.; EWALD, 2020). A Toxoplasmose é classificada como uma das doenças parasitárias de origem alimentar que mais ocorre no

mundo. Por esta razão a toxoplasmose congênita ainda é um grave problema clínico. Recentemente o *T. gondii* vem sendo associado com doenças neurológicas e psiquiátricas crônicas, particularmente a esquizofrenia e o transtorno bipolar (DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ et al., 2019).

O oocisto é o estágio do parasita em que o gato libera as fezes contaminadas no ambiente. Essa fase do ciclo desempenha um papel importante na epidemiologia do parasita, pois a contaminação do solo pode se estender para água. A biologia dos oocistos pode explicar ainda mais a distribuição global do *T. gondii* e os meios pelos quais ele evoluiu para ser um dos agentes infecciosos mais prevalentes em animais e humanos (SHAPIRO et al., 2019).

O *T. gondii* realiza no intestino dos hospedeiros definitivos as fases sexuada e assexuada da reprodução. Os bradizoítos ao serem ingeridos pelos hospedeiros definitivos passam por várias rodadas de reprodução assexuada antes da fase sexual. A reprodução sexual leva à produção de oocistos não esporulados que, após sua liberação no ambiente passa a esporulação que geram oocistos maduros (ZHANG et al., 2019). O oocisto se rompe no intestino, liberando os esporozoítos que invadem os enterócitos. Dentro do enterócito, cada parasito é denominado taquizoíto. Um estudo recente sugere que o parasita pode responder à presença do ácido linoleico no intestino do felino como um sinal crítico para a diferenciação do estágio sexual nessas espécies. Os mecanismos que tornam o epitélio do intestino desses animais especiais ainda requerem muitos estudos, mas já é bem estabelecido que no processo de endodiogenia o *T. gondii* sofre replicação assexuada, quando replica o seu genoma haploide se dividindo em duas células filhas (KOCHANOWSKY; KOSHY, 2018).

Figura 1: A – Representação esquemática assinalando as principais organelas e estruturas conforme observações em microscopia eletrônica de transmissão. B – Microscopia eletrônica de transmissão de uma forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. Neste corte longitudinal podem ser observadas várias das estruturas representadas em A: N (núcleo), c (conóide), R (roptrias), A (apicoplasto), CG (complexo de Golgi), g (grânulo denso), seta (micronema), VP (vacúolo parasitóforo). Barra de 1 μm (ATTIAS et al., 2014).

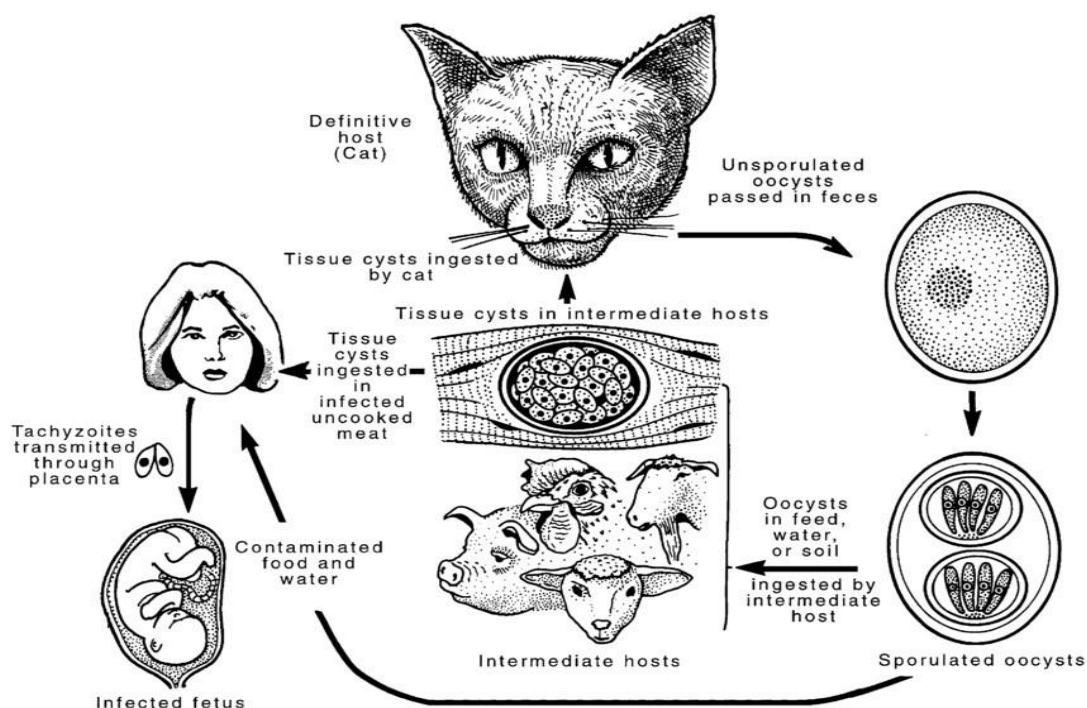


O taquizoíta haploide possui uma rápida replicação e migra por todo o hospedeiro. Ao encontrar tecidos específicos como músculo cardíaco, esquelético e o cérebro, o taquizoito se converte em bradizoito, sendo capaz de produzir cistos e se replicar de forma lenta neste estágio. O cérebro é o principal órgão de encistamento, onde pode permanecer por toda vida do hospedeiro, entrando no sistema nervoso central, que provavelmente entra no cérebro pela vasculatura. Como as células endoteliais dos capilares cerebrais são unidas por junções compactas, o *T. gondii* deve ter um mecanismo para cruzar a barreira hematoencefálica (KOCHANOWSKY; KOSHY, 2018). Atualmente, nenhum tratamento foi desenvolvido para eliminar os cistos teciduais, talvez devido ao crescimento lento dos bradizoítos, seu sequestro dentro dos neurônios e / ou a dificuldade de desenvolver drogas que cruzem a barreira hematoencefálica. Esta é

uma área de grande necessidade, pois novos haplótipos de *T. gondii* estão surgindo que se associam com doença ocular grave em pacientes imunocompetentes (ZHAO, X. et al., 2020).

A infecção aguda pode causar sintomas semelhantes aos da gripe. Os indivíduos imunocompetentes eliminam a maioria dos parasitas durante a infecção aguda. A resposta imune ao *T. gondii* é sustentada durante a infecção crônica, e isso é evidente em níveis elevados de imunoglobulinas classe IgG específica anti-*T. gondii* e presença de interferon-gama (IFN- γ) no soro, ambos essenciais para a restrição do parasita. Se o sistema imunológico for suprimido durante a quimioterapia, transplante de órgãos ou SIDA, por exemplo, *T. gondii* pode reverter para a replicação de taquizoíto. Esse processo, conhecido como recrudescência, pode ser letal se a parasitemia não for controlada com medicamentos (ZHAO, X. et al., 2020).

Figura 2 - *Toxoplasma gondii* e o seu ciclo de vida (DUBEY; LINDSAY, 1998)



Toxoplasma gondii é um parasita protozoário intracelular obrigatório, do filo *Apicomplexa*, e a característica distintiva desses seres é a presença de organelas na extremidade apical que permitem a invasão nas células hospedeiras. Outra particularidade é possuir funções metabólicas específicas como a síntese de

ácidos graxos. O *T. gondii* é capaz de invadir qualquer célula hospedeira *in vitro* porque não precisa de nenhum receptor ou proteína. Ao invadir ele leva consigo a membrana do hospedeiro, criando assim um vacúolo parasitóforo à sua volta. Outros mecanismos envolvidos na invasão são dados pelas organelas secretoras, micronemas e roptrias. O primeiro possui proteínas utilizadas para a invasão e a motilidade extracelular. O segundo também possui proteínas para invasão, entretanto as proteínas efetoras são fundamentais para a manipulação das células hospedeiras, pois são liberadas durante a invasão, os grânulos densos secretam proteínas ao mesmo tempo em que as roptrias, juntas elas permeiam parede do vacúolo parasitóforo (KOCHANOWSKY; KOSHY, 2018).

1.3 Cultivo parasitário

No cultivo parasitário do *T. gondii* é necessária a manutenção prolongada da infectividade do taquizoítos vivos e ativos. Os métodos mais comuns de replicação do *Toxoplasma gondii* em laboratórios de pesquisa são o uso de animais como camundongo, embriões de ovos e a cultura celular, além da criopreservação da cepa. Os métodos citados possuem dificuldades e complicações; alto custo, pessoal treinado, recursos estruturais, autorização do comitê de ética para o uso de animais pois há a necessidade da passagem em animais a cada 2-3 dias frequentemente (EL-BAHY et al., 2018). Até o momento há apenas vacinas antiparasitárias para prevenir o aborto em rebanhos de ovelhas, mas ainda não há vacina para prevenir toxoplasmose em humanos (DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ et al., 2019).

O *Toxoplasma gondii* interage com o epitélio do intestino delgado do seu hospedeiro, após ingestão de alimentos ou água contaminados. No epitélio intestinal ocorre a infecção conforme o sistema imunológico, se tornando assim, um mecanismo importante para o estudo de possíveis vacinas e adjuvantes. Porém falta um modelo de infecção que simule essa interação e suas vias moleculares. Um exemplo que surge para suprir essa necessidade é a cultura *in vitro* do epitélio do intestino delgado, constituindo agregados denominados enteroides. Nessa metodologia há uma maior suscetibilidade a infecção, suporte à replicação do

parasita, culturas que retêm a polarização epitelial e células epiteliais totalmente diferenciadas. A metodologia já mostrou que a infecção está associada a regulação de proteínas e o metabolismo do colesterol, exossomos e agregação celulares. Esses novos modelos, portanto, oferecem ferramentas tratáveis para investigar como as interações entre *T.gondii* e o epitélio intestinal do hospedeiro influenciam o curso da infecção (LUU et al., 2019)

Os pesquisadores que trabalham com o *T. gondii* necessitam da inoculação contínua em animais para que possam realizar a experimentação *in vitro*. Na reprodução usual do parasita utiliza-se o inóculo de taquizoítos em modelos roedores. Após a reprodução do parasita *in vivo*, os animais são eutanasiados e os taquizoítos podem ser colhidos por meio de lavagens intraperitoneais (PORTES et al., 2017). No entanto, modelos animais são dispendiosos e carregam em sua execução uma série de fatores de complicação, como alto tempo de execução, e custo, além de fornecer pouca precisão experimental em infecções individuais (DANIELSON et al., 2018).

Existem inúmeras técnicas de cultivo do *T. gondii* em monocamada de células (2D) *in vitro*, eles ajudam na diminuição do uso de animais, mas é complexo e mais trabalhoso que o método *in vivo*. A principal problemática da cultura bidimensional em monocamada de *Toxoplasma* contínuo *in vitro* é a perda permanente de infectividade dos taquizoítos (HARMER et al., 1996).

Foram produzidas algumas técnicas de cultura celular em 3D que visam imitar as características morfológicas e funcionais de células e tecidos *in vivo* na tentativa de fornecer um modelo fisiológico relevante para investigar interações parasita-hospedeiro. A morfologia alterada das células cultivadas em culturas 2D como monocamadas planas pode afetar a morfologia do parasita (FIRDAUS et al., 2020), como resultado das forças mecânicas que atuam na célula infectada e da pressão hidrostática do meio de cultura. A infecção por *Toxoplasma gondii* baseado em culturas de células 2D, não é a ideal pois não possui as principais condições de infecções do *in vivo*, devido a presença de pressões e tensões artificiais, que podem alterar processos infecciosos que dependem da espacialidade, por exemplo, invasão, replicação e saída. “Os modelos tridimensionais de cultura de

células (3D) podem preencher lacunas entre culturas bidimensionais de monocamada (2D) e modelos animais” (DANIELSON et al., 2018).

O cultivo celular tridimensional (3D) *in vitro* pode simular um microambiente dos tecidos *in vivo* para fornecer informações fundamentais da interação célula a célula. Esses dados estão sendo utilizado no entendimento das características tumorais, perfil metabólico, pesquisa de células tronco e em descobertas farmacológicas. As células com nanopartículas paramagnéticas ao sofrerem influência de uma levitação magnética são capazes de formar os esferoides. Essa metodologia proposta de cultura de células 3D tem o potencial de fornecer formas alternativas para estudar o comportamento de órgãos por meio da construção de organoides (JENSEN; TENG, 2020). As nanopartículas paramagnéticas de óxidos de ferro, (PION's, *paramagnetic iron oxide nanoparticles*) são bem toleradas por tecidos *in vivo*. A nanotecnologia possui propriedades únicas da escala nano de 1-100 nanômetros que permitem que as nanopartículas proporcionem uma ampla gama de tratamentos. Um exemplo disso é o uso clínico como contraste para ressonância magnética (RM) (WALLE et al., 2019).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a infecção de *Toxoplasma gondii* em esferóides celulares sustentados por nanopartículas paramagnéticas de óxido de ferro (PIONS) biofuncionalizadas, para a replicação eficiente do parasita *in vitro*. Também tem como objetivo propor um protocolo de reprodução parasitária com segurança biológica, diminuição do uso de animais, sem comprometer a viabilidade do parasita.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o comportamento do *Toxoplasma gondii* em cultivo tridimensional com a cepa tipo I (RH) para avaliar a reprodução de taquizoitos em esferóides.
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas.
- Comprovar a invasão parasitária na microestrutura celular.
- Avaliar a viabilidade celular e parasitária

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Culturas de Células

A cultura de células de mioblastos de camundongo C2C12 (ATCC® CRL-1772) e fibroblasto de camundongo NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658), foram realizadas em meio RPMI 1640, pH 7,4 (Gibco, Grand Island, EUA), com suplementação de soro fetal bovino a 10% (Cultilab, Campinas, Brasil), 2g / L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃, Sigma-Aldrich, Brasil) e 1% de solução de penicilina e estreptomicina (10000 U / 10000 µg / mL, Gibco, Carlsbad, EUA) em frascos plásticos estéreis para cultura celular com 25cm² de área de cultivo (Corning, Tewksbury, EUA) mantidos em incubadoras em atmosfera e temperatura controladas (95% O₂, 5% CO₂, 37°C), até confluência estimada de 60 a 70%. A subcultura ocorreu após o esgotamento do meio de cultura utilizado, lavando o tapete de células com solução salina-fosfato tamponada (PBS, solução salina tamponada com fosfato) contendo EDTA 5mM (ácido etilenodiaminotetracético, etilenodiaminotetracético, etilenodiaminotetracético, Sigma-Aldrich, Brasil). Após a separação das garrafas, as células foram suspensas no meio RPMI 1640 e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos em tubos cônicos de 15 mL (Corning, Tewksbury, EUA). Somente uma fração viável, especificada pela incorporação do corante vital azul de tripano a 0,4% (Life Technologies, Carlsbad, EUA) foi usada para subcultura ou experimentação.

4.2 Produções de nanopartículas paramagnéticas para o cultivo por levitação magnética

Suspensões de nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄) foram produzidas como descrito pelo grupo anteriormente (BONFIM et al., 2019), alterando-se a fonte de energia para redução de íons Fe²⁺ livres. Concentrações de sulfato de ferro II heptahidratado (Fe₂SO₄.7H₂O, CAS 7782-63-0) e glicina (NH₂CH₂COOH, CAS 56-40-6) foram diluídos em água ultrapura livre de O₂ em pH 12 obtido por titulação com hidróxido de sódio (NaOH). Volumes desta solução foram irradiadas em no acelerador de elétrons com sistema de esteira do Centro de Tecnologia das

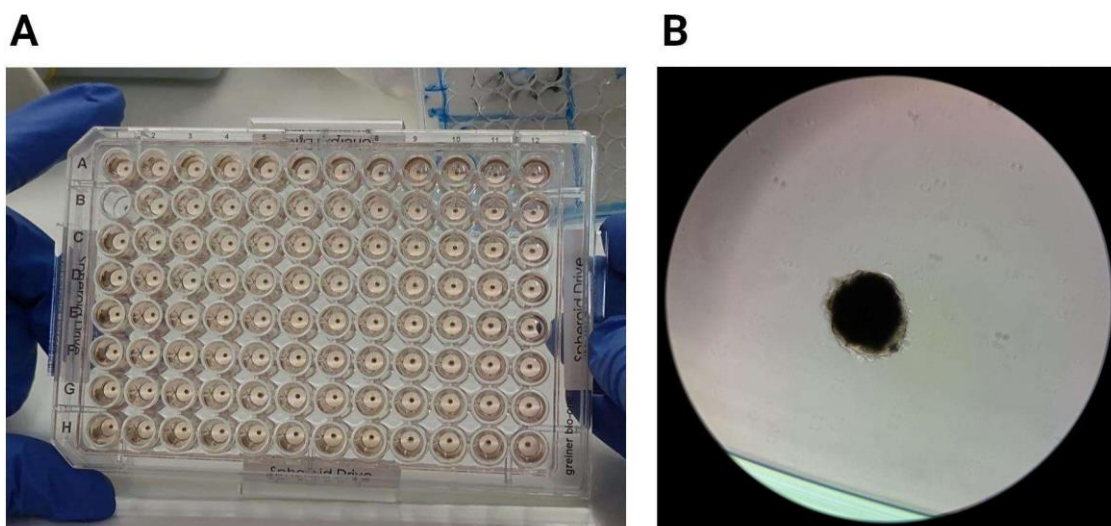
Radiações IPEN/CNEN-SP em doses de no mínimo 15 e no máximo 30kGy. Foi formado um precipitado preto, que foi separado da fase líquida por atração magnética e lavado com água ultrapura. Em seguida foi adicionado 15 mL de ácido acético e a solução foi mantida em ultrassom por 5 minutos.

Após esse processo o ácido acético foi removido e uma solução de brometo de poli-lisina (D-Lys-(D-Lys)_n-D-Lys . xHBr) em água ultrapura sob pH 7 foi adicionada e mantida em ultrassom por mais 5 minutos. A poli-lisina é portadora de grupos amina protonáveis em pH fisiológico, o que conferiu carga positiva às partículas e possibilitou a interação eletrostática com as células, levando à adsorção das partículas pelas membranas celulares. O conteúdo final de nanopartículas foi lavado novamente com água ultrapura estéril e estocada a 4 °C até o momento da sua aplicação à cultura celular para posterior formação dos esferoides. A quantidade de ferro nos colóides formados foi quantificada segundo metodologia descrita anteriormente (DEDA et al., 2017), usando ensaio colorimétrico quantitativo com 2,2'-bipyridil (C₁₀H₈N₂, Sigma-Aldrich).

4.3 Esferoides

As células foram associadas às partículas produzidas. A formação dos esferoides consistiu na exposição de culturas celulares a quantidades de nanopartículas por 24 horas. Após este período, foi feita a tripsinização. As células foram centrifugadas e ressuspendidas com as nanopartículas no volume calculado de meio de cultura para o plaqueamento, 100 µL de suspensão celular. As células com nanopartículas foram semeadas (10⁴ células/poço) em placas de 96 poços produzidas em plástico repelente às células (Cell Repellent, GreinerBioOne), e uma placa com 96 ímãs (Magnetic drive, GreinerBioOne) foi mantida abaixo dos poços em incubadora para a agregação das células. Após a obtenção de esferoides coesos o ímã foi retirado e a placa foi incubada para que os esferoides se adequassem à morfologia da linhagem. Também foram utilizadas placas de 6 poços recobertos com agarose (1% em PBS) para minimizar a adesão celular. Neste caso, os esferoides foram formados por 5x10⁴ células/poço e suspensos por ímãs de 32mm de diâmetro posicionados acima das culturas, nas tampas das placas.

Figura 3: Aspecto geral dos esferoides. A: Placa repelente a células contendo 96 esferoides de C2C12. B: Aspecto típico de esferoides de C2C12. Aumento: 10X



4.4 Ensaio de citotoxicidade

As células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de $1,0 \times 10^4$ células / poço em 100 μ L. As placas foram incubadas durante 24h. Após a incubação as células foram tratadas com uma diluição em série de PION's e meio RPMI. As células foram tratadas com concentrações entre 8 vezes maiores ou 8 vezes menores (1/8) que a utilizada rotineiramente (12mM de Fe). A placa foi incubada novamente por um período de 24 horas nas mesmas condições. Após o tratamento, os poços foram lavados com PBS, adicionando 100 μ L por poço para remover possíveis resíduos da amostra. O meio de cultura foi aspirado e as células foram suplementadas com 2 mg / mL de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) - 2H-tetrazólio (CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS), Promega) e 0,9% de metossulfato de fenazina (PMS, Sigma-Aldrich, CAS 299-11-6) diluídos em meio de cultura (120 μ L) foi adicionado e a placa foi incubada por 2 h. Finalmente, a placa foi submetida a análise espectrofotométrica a 490 nm de comprimento de onda pelo equipamento Multiskan EX[®]. Como controle positivo foi utilizado extrato de látex (0,5g/mL em

meio de cultura e incubado a 37°C por 24 horas) e negativo 5µL de solução de NaCl 0,09%.

Os gráficos foram obtidos no software GraphPad Prism® 8 onde as análises estatísticas foram feitas por meio da 2way-ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni

4.5 Parasitas

O *Toxoplasma gondii* (linhagem RH) é mantido rotineiramente no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMTSP), sob supervisão da Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman. Os taquizoítos foram colhidos até 96 h após inóculos intraperitoneais em camundongos da linhagem Swiss através de lavagens intraperitoneais estéreis com meio de cultura celular. Após 96 horas de formação de esferoides os mesmos foram inoculados com a concentração de 1×10^4 taquizoítos / poço (esferoide), em experimentos supervisionados pelo Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr.

4.6 Ensaio de Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras foram armazenadas em tubos de vidro contendo glutaraldeído ($C_5H_8O_2$) e processadas no laboratório do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, sob supervisão da Sra. Cleuza Takakura do setor de Moléstias Transmissíveis. As amostras foram centrifugadas por 3 min a 6000 rpm e lavadas 2x com solução tampão cacodilato 0,1M pH 7,4 com sacarose e centrifugadas novamente por 3 min. Após centrifugação foram colocadas em tampão colidine (tetroxido de ósmio), homogeneizadas em vórtex e mantidas por 30 min na solução. Em seguida foram lavadas com tampão cacodilato e a mantidas em uranila alcoólica por 5 min. Após os 5 min, as amostras foram lavadas 2x com álcool etílico 70% e depois 2,2-dimetoxipropano por mais 5 min. O 2,2-dimetoxipropano foi retirado e foi adicionado acetona por 5 min. Após retirada do álcool, a resina preparada 1:1 foi adicionada por 30 min. A resina foi retirada novamente, para adicionar a resina pura e manter por 10 min. O *pellet* no tubo foi

suspensão com auxílio de uma pinça para melhor penetração da resina e deixado em uma estufa a 40°C por 10 min. O material foi moldado em formas em estufa a 100°C por 18 horas.

Após solidificação da resina, o bloco foi desbastado para exposição parcial da amostra. Foram realizados cortes de espessura de 0,5 µm (semifino) e 0,008 µm (MET). A coloração para o semifino foi feita com azul de toluidina. Foi utilizada uma lâmina de diamante para cortar o material e água deionizada para deposição do material cortado. A amostra foi armazenada em grades de cobre de 3mm e *mesh* de 200µm. Essas grades após incorporação do material foram secas com papel filtro de 11 cm. Para coloração o material foi deixado em acetato de uranila saturado (aquoso) por 15 min. Depois lavado em água deionizada e deixados na solução de citrato de chumbo e citrato de sódio por 8 min. Após este período a solução foi descartada em um local apropriado e o material foi lavado novamente com água deionizada e armazenado em vidros após secagem. Os tomos foram observados no microscópio JEM 1011 (JEOL) operado pelo LIM59 – Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.7 Microscopia de Fluorescência para teste de estabilidade do esferoide.

Os esferoides foram corados usando Hoescht 33242 (5 µg / mL) e iodeto de propídio (50 µg / mL) adicionados ao meio de cultura e incubados ao abrigo da luz por 10 min. Após este período, o meio de cultura foi removido e substituído por PBS para visualização da fluorescência. Os esferoides foram então visualizados no microscópio invertido Nikon Eclipse TS 100, acoplado a um módulo de excitação por LED Lumencar® Mira Light Engine (4-NII-FA). Quando observados com excitação na faixa do violeta, o DNA dos núcleos apareceu em azul; quando a excitação ocorreu na faixa do verde, núcleos inviáveis / células mortas foram marcadas por iodeto de propídio e apareceram em vermelho. Foram realizadas aquisições separadas e em conjunto para cada um dos comprimentos de onda utilizados.

4.8 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Para realizar a extração de DNA dos esferoides/parasitas, foram retirados da placa de cultura ainda íntegros e depositados em microtubos de 1,5 mL juntamente com 200 μ L de solução salina tamponada PBS. Cada amostra foi submetida à extração de DNA genômico usando o kit de DNA QIAmpMini Kit (Qiagen® GmbH) de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram analisadas usando espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Middlesex) e apresentaram concentrações 0,9 e 1,6 μ g / μ L.

Uma região do gene B1 foi amplificada usando um protocolo de PCR do Laboratório de Protozoologia do IMTSP. Todas as misturas de reação foram preparadas num volume final de 10 μ L contendo 2 μ L de DNA genômico, 5 μ L de NZYTa₂ × Verde Master Mix (NZYTechLda, Lisboa, Portugal), 2 μ L primer e água livre de RNase para obter o volume. A reação foi realizada usando o iniciador direto TOXO1: 5' - GCACCTTTCGGACCTCAACAACCG-3') e o iniciador reverso (TOXO2: 5' - TTCTCGCCTCATTCTGGGTCTAC-3'). A amplificação foi realizada em um termociclador Step One Plus™ (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando o seguinte perfil cíclico: desnaturação inicial em 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação adicionada à 94°C por 1 min, anelamento a 62°C por 30s e uma extensão a 72 °C por 1 min, seguida de uma extensão final para 10 min a 72 °C. Como controle positivo foi utilizado um extrato de DNA total de *T. gondii*, cepa RH purificado conforme descrito. Os produtos amplificados foram resolvidos em géis de agarose 1% em tampão Tris-Borato EDTA (TBE) corados com solução de brometo de etídio (10 μ g / mL) (VERONESI et al., 2017).

4.9 Análise de micrografias (INCell Analyzer)

A incorporação de rodaminas por *T. gondii* é uma técnica razoavelmente bem descrita na literatura (DE MELO, E. J. T. et al., 1992; MELO, E. J. L. et al., 2000; TANABE, 1985). Após extração por lavagens peritoneais de camundongos infectados, suspensões com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* foram mantidas em

meio de cultura a 4°C. Os parasitas foram concentrados por centrifugação (200 x G/ 10 min e depois a 1000 x G/10min, temperatura ambiente). O *pellet* resultante foi ressuscitado com meio de cultura contendo 2µg / mL de Rodamina 123 (ThermoFisher Scientific, R302), e incubado a 30 min a 37°C. A viabilidade do parasita foi feita mediante ao teste por incorporação de azul de tripano.

Esferoides de células NIH/3T3 (5×10^3 células por poço) foram formados por levitação magnética em placas de plástico repelente, conforme descrito. Após 72h em cultura, foram cuidadosamente transferidos para poços de placas apropriadas à avaliação por microscopia invertida (µClear®, Greiner BioOne) e 80µL de meio de cultura contendo 5µg / mL de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, CAS 875756-97-1), que possui afinidade ao DNA nuclear e marcou os núcleos das células dos esferoides, e foram incubados por 30 minutos em estufa incubadora. Em seguida, cada esferoide recebeu 20µL da suspensão de taquizoítos, contendo 2×10^6 parasitas viáveis / mL.

Os esferoides foram pré-visualizados no microscópio Ts-100 para confirmação da fluorescência e posteriormente avaliados por microscopia de fluorescência imediatamente após o inóculo (0h) e 0,5, 2, 4 e 24 horas após, utilizando o equipamento INCell Analyzer HS 2500 (Cytiva). Foram geradas *stacks* de imagens, com até 20 aquisições cada uma, espaçadas no eixo z por 4µm e uma *stack* para cada comprimento de onda avaliado – Canal “Green” avaliou a fluorescência verde, emitida por taquizoítos marcados por Rodamina 123; Canal “Blue”, capturou a fluorescência do Hoechst 33342 nos núcleos das células NIH/3T3 dos esferoides e Canal “Brightfield” capturou as imagens em campo claro. O equipamento foi ajustado para realizar uma aquisição de imagem em 2D a cada 4µm de profundidade dos esferoides, partindo do interior para a periferia dos mesmos. Foi utilizado o aumento de 10X, aplicando-se o algoritmo *3D Convolution* para posterior análise das estruturas tridimensionais. As *stacks* adquiridas no canal “Blue” foram analisadas utilizando o pacote IN Carta 1.14 (Cytiva). Foram avaliados os parâmetros: quantidade de núcleos de NIH/3T3; área da seção transversal do esferoide e cálculo de volume do esferoide.

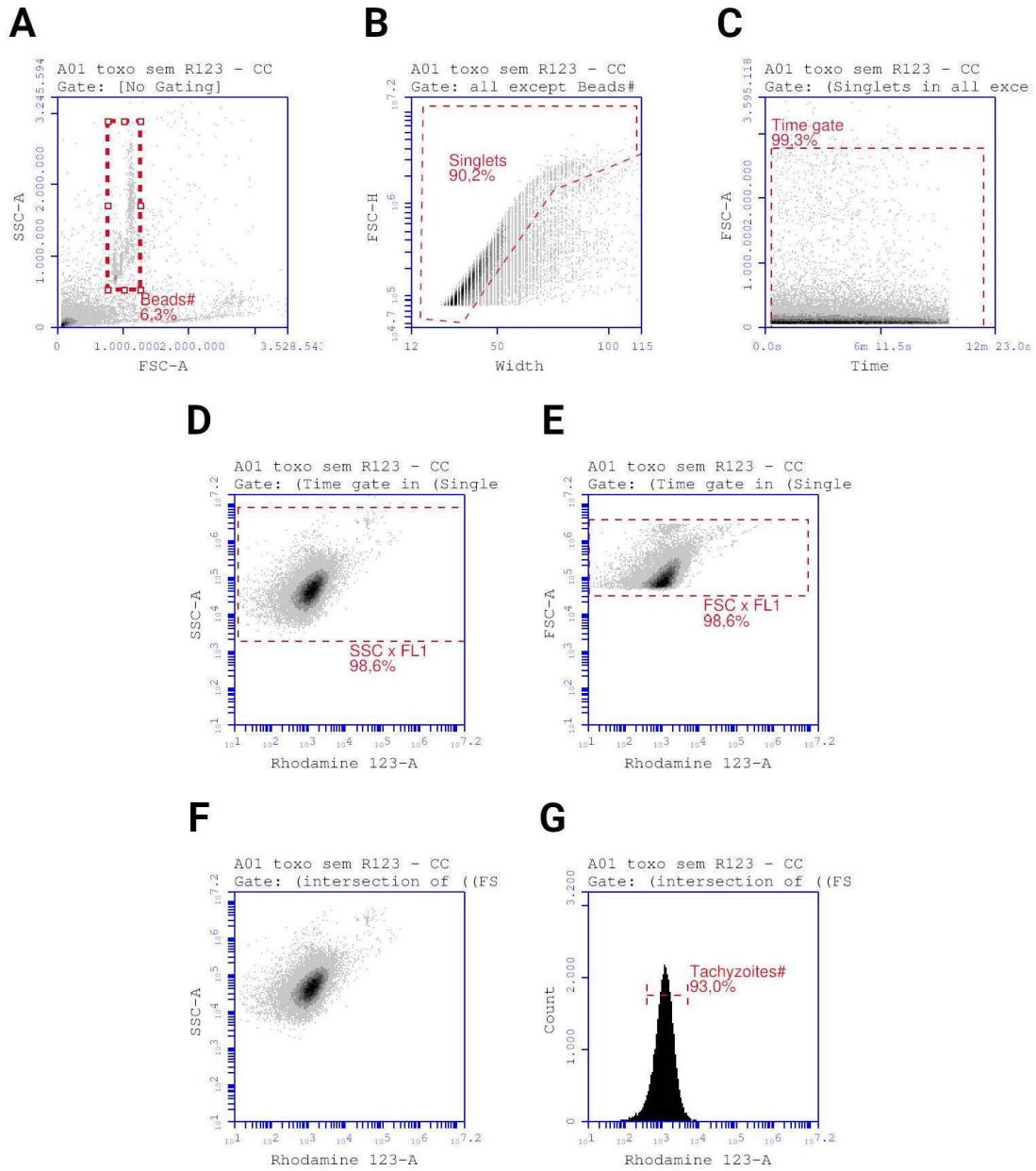
Para encontrar taquizoítos no meio extracelular, as *stacks* adquiridas no canal “Green” foram analisadas também usando o mesmo *software*. Para seleção

apenas de eventos relevantes, os parâmetros do programa foram ajustados para considerar apenas eventos com volumes entre 10 e $30\mu\text{m}^3$, conforme dados de microscopia de alta resolução sobre volumes de taquizoítos em condições de cultura (FIRDAUS et al., 2020).

5.0 Citometria de Fluxo

Os esferoides de NIH/3T3 (3×10^3 células) com 72 horas após o início da agregação por ímãs foram infectados 1×10^6 por taquizoítos. Com 24, 48 e 72h de inoculação, $80\mu\text{L}$ (80%) do meio de cultura de cada poço foi retirado em seguida corado por 0,5h com Rodamina 123 conforme descrito. Após duas lavagens com PBS as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e ressuspensas em $200\mu\text{L}$ de PBS contendo $10\mu\text{L}$ de microesferas fluorescentes de látex (AccuCheck Counting Beads - Thermo-Fisher Scientific, PBC100). Estas esferas possuem diâmetro médio de $6\mu\text{m}$ e na análise por citometria de fluxo apresentam-se em duas populações bem discriminadas em *plots* FSC x SSC e em FL-2 (585/40 nm) mediante excitação. Rodamina 123 foi excitada pelo laser do equipamento (488nm) e sua emissão capturada pelo canal FL-1 (530/30 nm). Cada amostra foi formada pela adição do volume de meio de cultura coletado de poços em quadruplicata. As quantidades de taquizoítos e de *beads* foram determinadas e variações na quantidade de taquizoítos foram expressas pela proporção entre o número dos mesmos e o número de *beads* adquiridas (proporção T/B, ou *ratio*). Foram capturados $180\mu\text{L}$ por amostra. Os eventos relevantes (taquizoítos e microesferas) foram selecionados nas *plots* geradas pelo equipamento utilizando a estratégia mostrada na Figura 4.

Figura 4: Estratégia de gates utilizados para avaliação das quantidades de taquizoítos de *T. gondii* nos cultivos celulares. A - *Beads*: região em SSC-A x FSC-A que continha as microesferas de látex; B - *Singlets*: região em FSC-H x Largura que continha os eventos únicos, excetuando-se os eventos duplos; C - *Time gate*: Região em FSC-A x Tempo de aquisição, desconsiderando-se eventuais variações na velocidade de aquisição; D e E - Regiões em SSC-A x FL1 e FSC-A x FL1 que correspondiam a parâmetros de tamanho e complexidade compatíveis com os parasitas; F e G - População de eventos devidamente analisadas e representativas de taquizoítos de *T. gondii* contidas em gráficos *dot plot* (F) ou histograma (G).

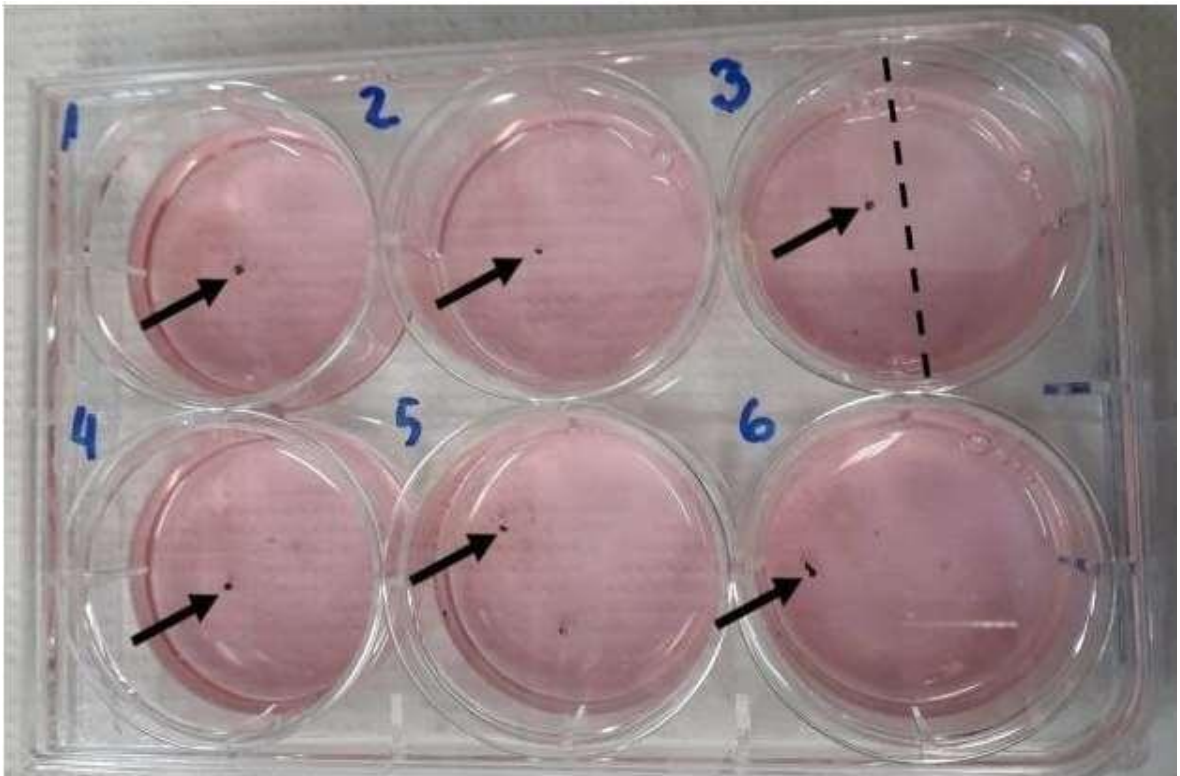


6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Nanopartículas produzidas por radiação ionizante e formação esferoides celulares

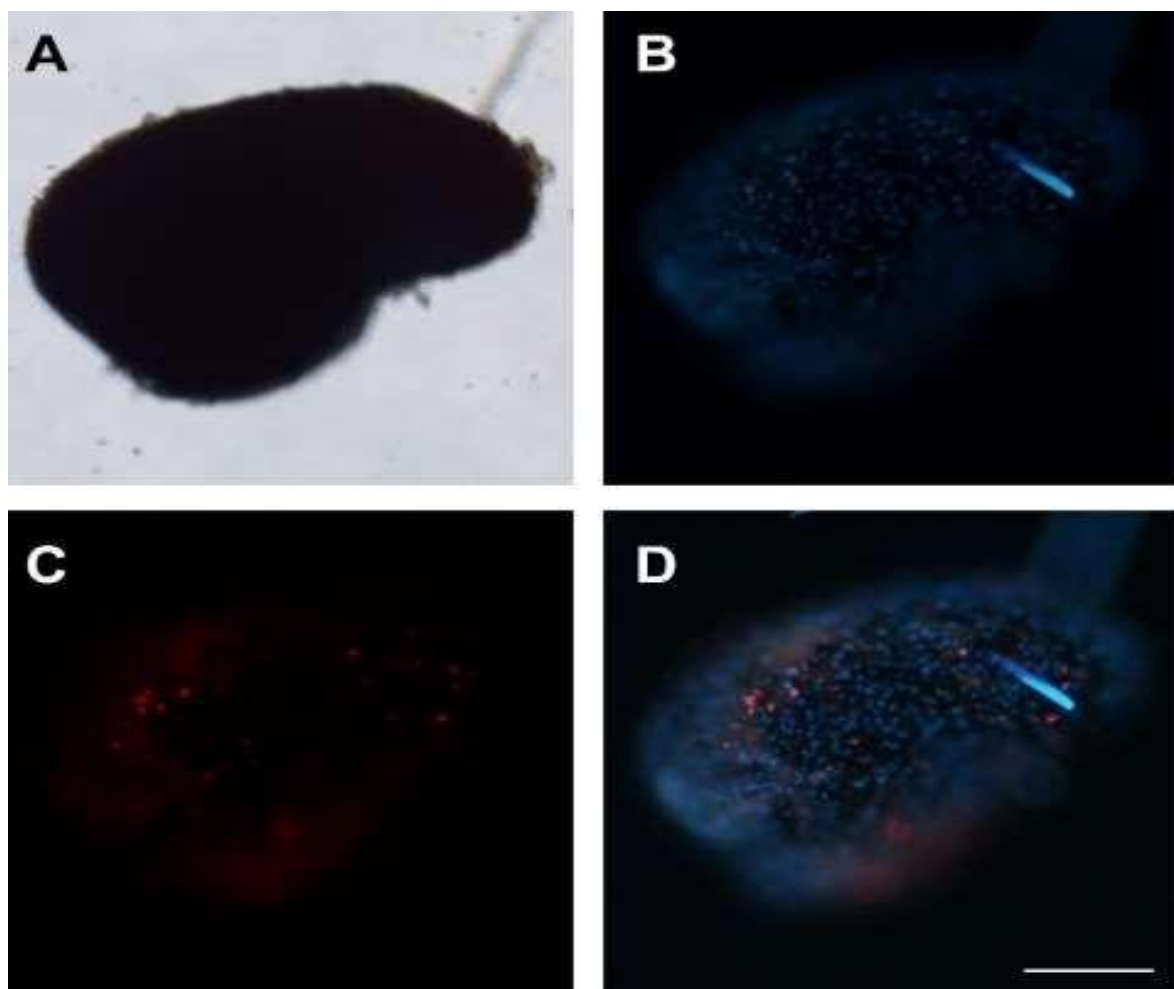
As nanopartículas após síntese foram adicionadas a cultura de células, o volume de colóide adicionado equivale a 12 mM de ferro, valor preestabelecido na rotina do laboratório. Na Figura 5 pode ser observado o resultado dessa interação, onde ao internalizar o ferro, as células ficam suscetíveis a influência do campo magnético dos ímãs. Devido atuação da força magnética na carga das nanopartículas é gerado o agregado celular. É possível observar também o aspecto típico de esferoides de C2C12 após 96 horas de incubação, formados em placas de 6 poços com 5×10^4 células/poço.

Figura 5 - Esferoides de células C2C12 produzidos por levitação magnética em placas de 6 poços. Setas: esferoides. Linha pontilhada: diâmetro do poço: 34,8mm (dados do fabricante).



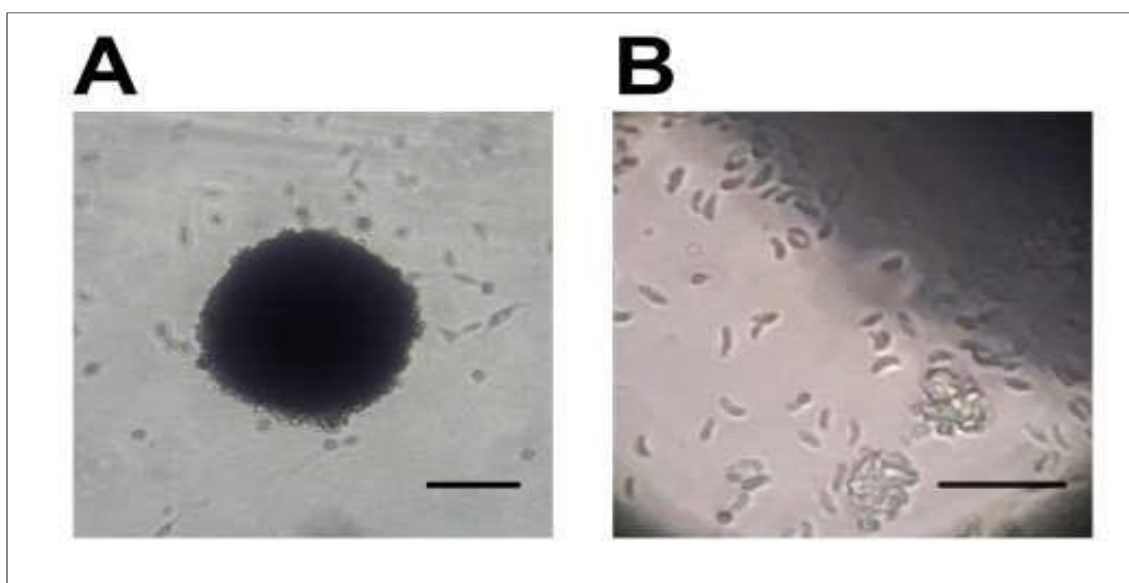
Ao utilizar 5×10^4 células / poço, a técnica gerou esferoides milimétricos, coesos embora relativamente friáveis, mas de manejo viável. Para avaliação da viabilidade geral das células dos esferoides foi feita uma coloração diferencial com os corantes Hoechst 33242 e iodeto de propídio. A Figura 6 é resultado desse teste mostra o aspecto típico de um esferoide mantido por 96 horas em cultura e corado com corantes fluorescentes conforme descrito. A coloração permitiu a avaliação da extensão da camada em vermelho, indicando áreas de células inviáveis. Em alguns pontos, permitiu a discriminação de núcleos de células inviáveis isoladamente, uma vez que o iodeto de propídio só penetra em células mortas. A imagem possui uma porção majoritária em azul que denota viabilidade celular, devido ao corante Hoechst 33242 que marca o núcleo das células.

Figura 6 - Estado geral de esferoides de células C2C12 produzidos por levitação magnética em placas de 6 poços. (A): visualização em luz branca. (B) excitação por fonte violeta, evidenciando todos os núcleos marcados com Hoechst 33242. (C) excitação por fonte verde, evidenciando apenas os núcleos de células inviáveis. (d) sobreposição das imagens em (B) e (C). Aumento: 20x. Barra: 200 μ m.



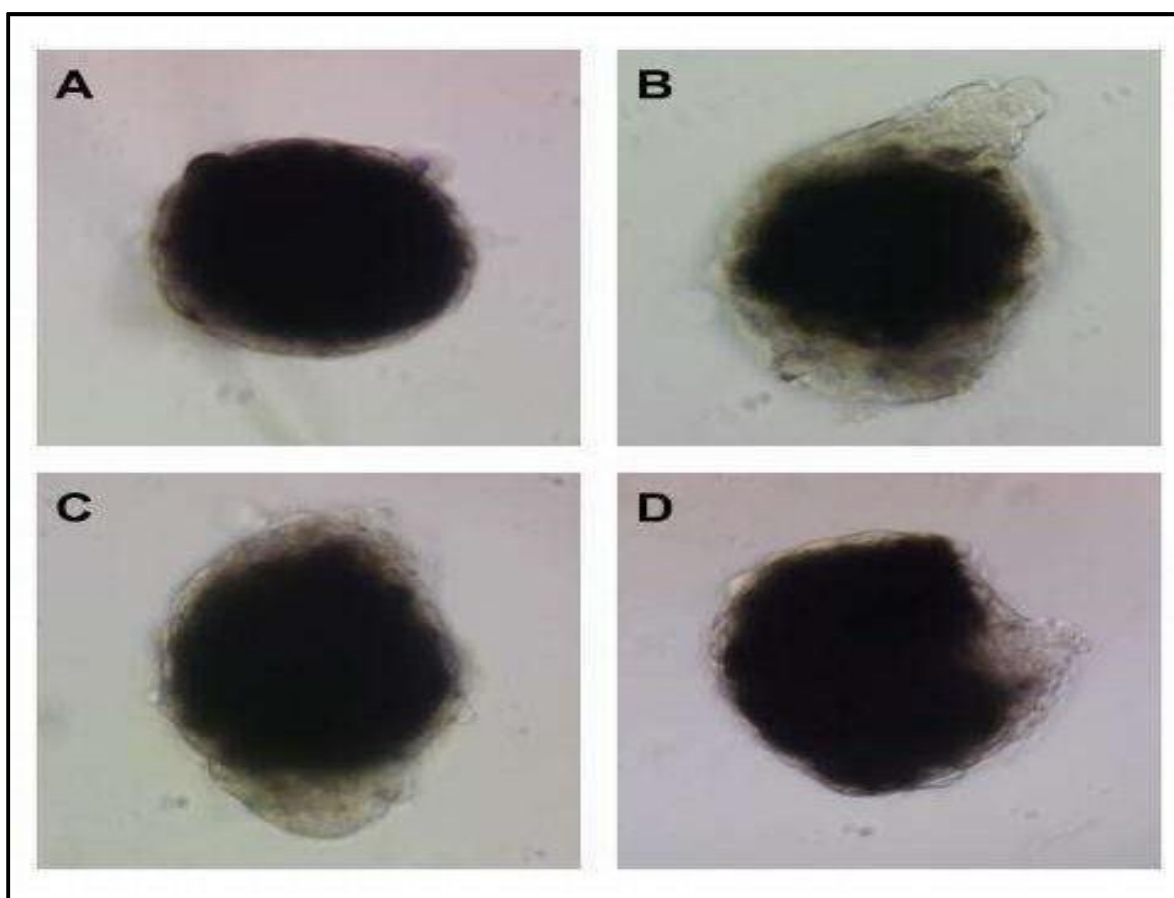
Tendo em vista, a viabilidade dos esferoides, inicialmente foram realizados inóculos diluídos com 500 parasitas / esferoide (1:100) para testar a capacidade de invasão do parasita nos esferoides. A Figura 7 mostra o aspecto típico de um esferoide cultivado como descrito, porém usando placas de 96 poços (A). Em (B) podem ser visualizados alguns taquizoítos livres de *T. gondii*, 24 horas após o inóculo. Não foi possível determinar se os taquizoítos da imagem são os componentes da própria suspensão de inóculo, ou são representantes de uma possível primeira geração de parasitas após duplicação intracelular nas células do esferoide.

Figura 7 - (A) Aspecto típico de um esferoide de C2C12 após 96 horas em cultura. Aumento: 10X. Barra: 100 μ m. (B) taquizoítos de *T.gondii* na região externa de um esferoide de C2C12 (sombra em semicírculo). Aumento: 40X. Barra: 25 μ m



Foram testadas concentrações diferentes de parasita em inóculos separados. Uma concentração considerada baixa, com 10^3 parasitas/esferoide de 5×10^4 células (1:50), e duas concentrações de valores mais altos ($1,6 \times 10^4$ parasitas / esferoide, 8:25; $3,2 \times 10^4$ parasitas / esferoide, 16:25). A Figura 8 mostra o aspecto dos esferoides nestas condições.

Figura 8 - Estado geral de esferoides de células C2C12 produzidos por levitação magnética em placas de 6 poços e inoculados com 0 (A), 10^3 (B), $1,6 \times 10^4$ (C) e $3,2 \times 10^4$ (D) taquizoítos de *T. gondii*. Aumento: 20X.



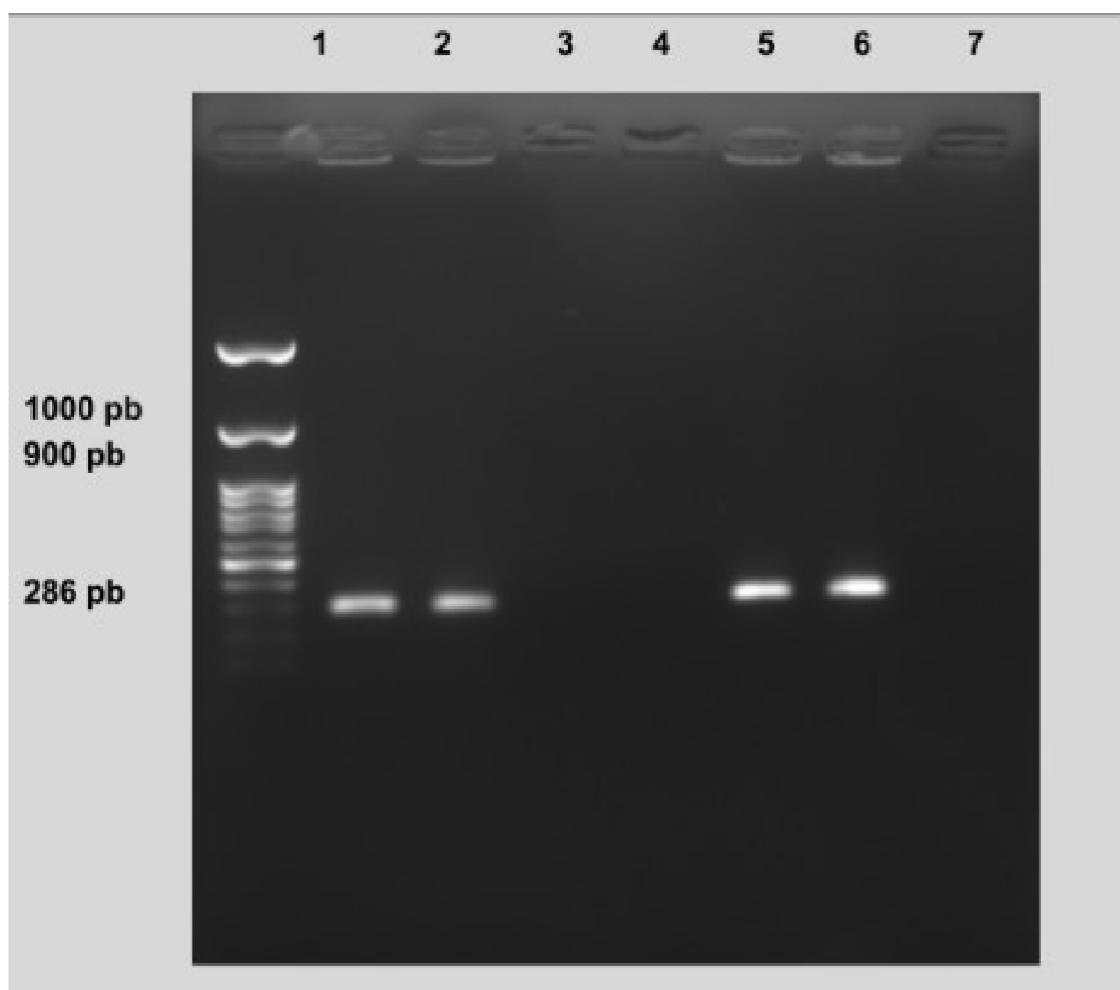
Houve a formação de cápsula fibrosa translúcida envolvendo o conteúdo celular opaco em todas as imagens, com ligeiro aumento nos esferoides inoculados por 10^3 e $1,6 \times 10^4$ parasitas. A dificuldade do cultivo *in vitro* reside na rápida duplicação, crescimento e ação parasitária do taquizoito da cepa RH (SARAF et al., 2017). Os resultados mostram certa necessidade de que a cultura celular seja rápida para que não haja degradação completa das células por parte do vacúolo parasitóforo (DUBEY et al., 1998), que consome a estrutura intracelular da célula hospedeira.

As primeiras condições para a manutenção do cultivo do parasita: 1) viabilidade celular global suficiente e 2) coesão e sustentação mecânica dada pela produção de matriz extracelular, que foram obtidas pelo trabalho. Esferoides corados com iodeto de propídio mostraram que as células inviáveis, quando existentes, são esparsas e em número menor que o de células viáveis, possibilitando o suprimento de material vivo necessário para a sustentação do cultivo *in vitro* do parasita.

6.2 PCR convencional de esferoides infectado com *Toxoplasma gondii*

Fragmentos de DNA amplificado obtidos conforme descrito foram submetidas a eletroforese em uma tensão de 75V no gel de agarose (1%) e o aspecto está mostrado na Figura 9.

Figura 9 - Gel de agarose contendo arrastes de DNA e quatro bandas na região de interesse 286bp. Marcador de tamanho (100 pb). **(1) esferoide infectado com 1×10^4 taquizoítos;** (2) Lavado peritoneal contendo 1×10^4 taquizoítos, de controle positivo; (3) esferoide de célula de C2C12, de controle negativo; (4) H₂O como branco da amostra. As amostras a seguir foram feitas com a MIX 2 **(5) esferoide infectado com 1×10^4 taquizoítos;** (6) Lavado peritoneal contendo 1×10^4 taquizoítos, de controle positivo; (7) esferoide de célula de C2C12, de controle negativo



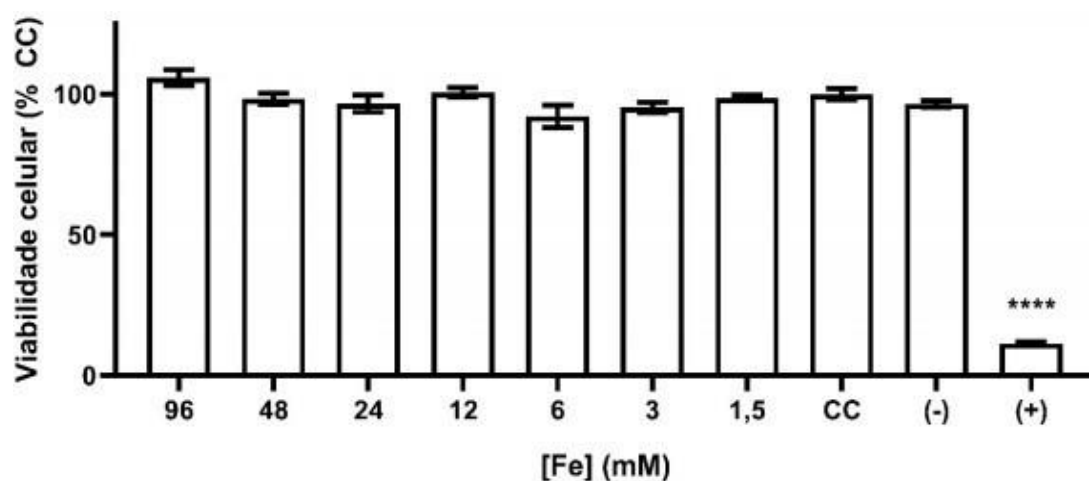
As bandas com hipersinal na região de interesse de 286 pb são positivas para a presença do gene B1 do parasita. As amostras 1 e 5 se referem a infecção do esferoide com 24h e 72h respectivamente, confirmando a interação dos parasitas com as células e a permanência do mesmo até 72h após a infecção, as demais amostras positivas são controles com lavado peritoneal de taquizoítos da cepa (RH). As amostras restantes com hiposinal são controles negativos: esferoides sem infecção e água (H₂O).

6.3 Avaliação das Nanopartículas de Fe₃O₄ no ensaio de citotoxicidade

Suspensões de PION's foram adicionadas às células em cultura para a verificação da possível citotoxicidade das partículas. A Figura 10 mostra os dados do experimento que utilizou quantidades que variaram entre oito vezes maior até

oito vezes menores que a concentração rotineiramente utilizada para adsorção e posterior levitação magnética. Os resultados foram analisados por ANOVA, com pós-teste segundo Bonferroni.

Figura 10 - Medida de viabilidade celular de culturas de C2C12 expostas a concentrações de nanopartículas (em função da concentração de Fe em mM). CC: controle de células (-) NaCl 0,09% em meio de cultura. (+) extrato de látex (0,5g/mL). (****): $p < 0,0001$ (em relação ao controle CC). Barras: médias dos erro-padrão.

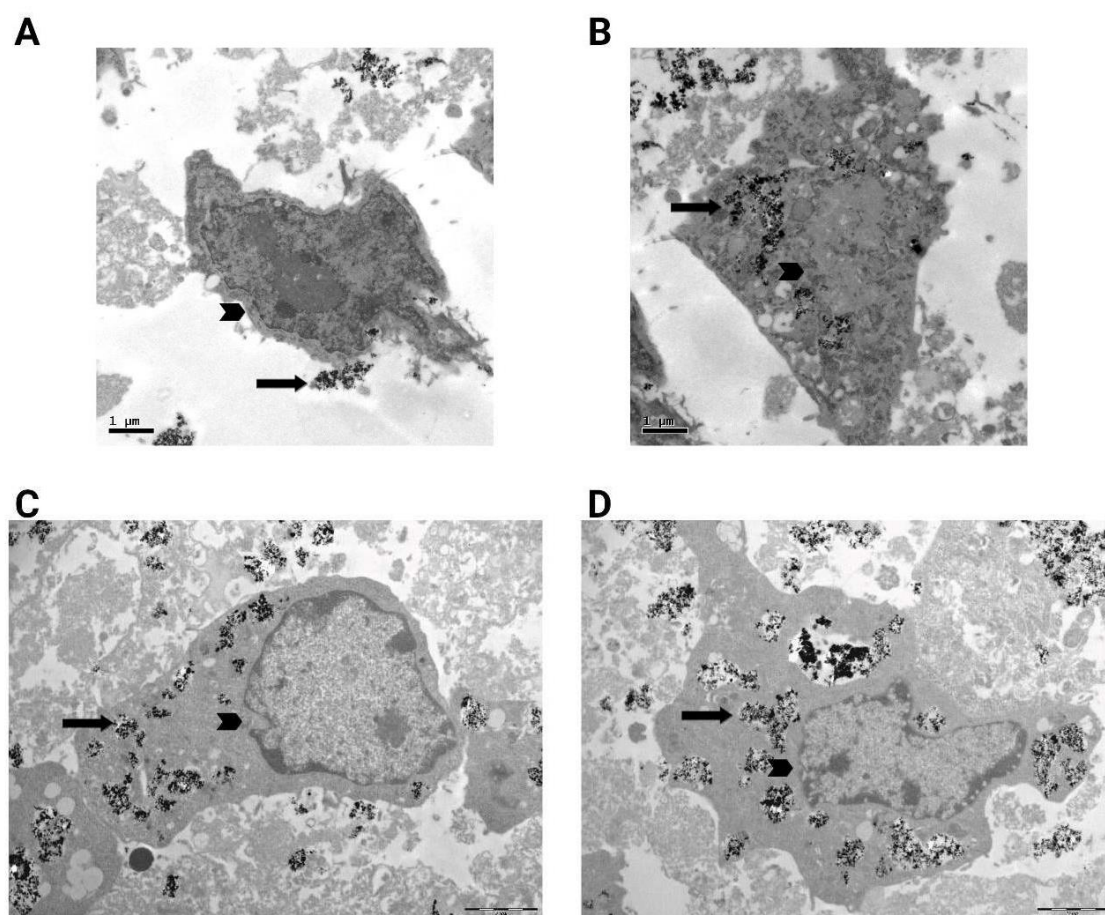


Nenhuma das concentrações foi capaz de induzir toxicidade nas células, atestando importante dado sobre a segurança do uso deste sistema para a geração de cultivos tridimensionais. Foi demonstrado que a adsorção das nanopartículas ocorre nos endossomos e envolve a subunidade H da ferritina. Além disso, parece ser este o processo principal para evitar citotoxicidade a longo prazo (WALLE et al., 2019).

6.4 Taquizoítos de *T. gondii* por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Esferoides de C2C12 infectados ou não com taquizoítos de *T. gondii* foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). O aspecto típico das células de esferoides desta linhagem está mostrado na Figura 11.

Figura 11 - Esferoides de células C2C12 produzidos por levitação magnética observados por microscopia eletrônica de transmissão. (A) e (B): Aumento 15000X.(C) e (D): Aumento 6200X. Setas: agregados de nanopartículas de magnetita. Divisas: núcleos.

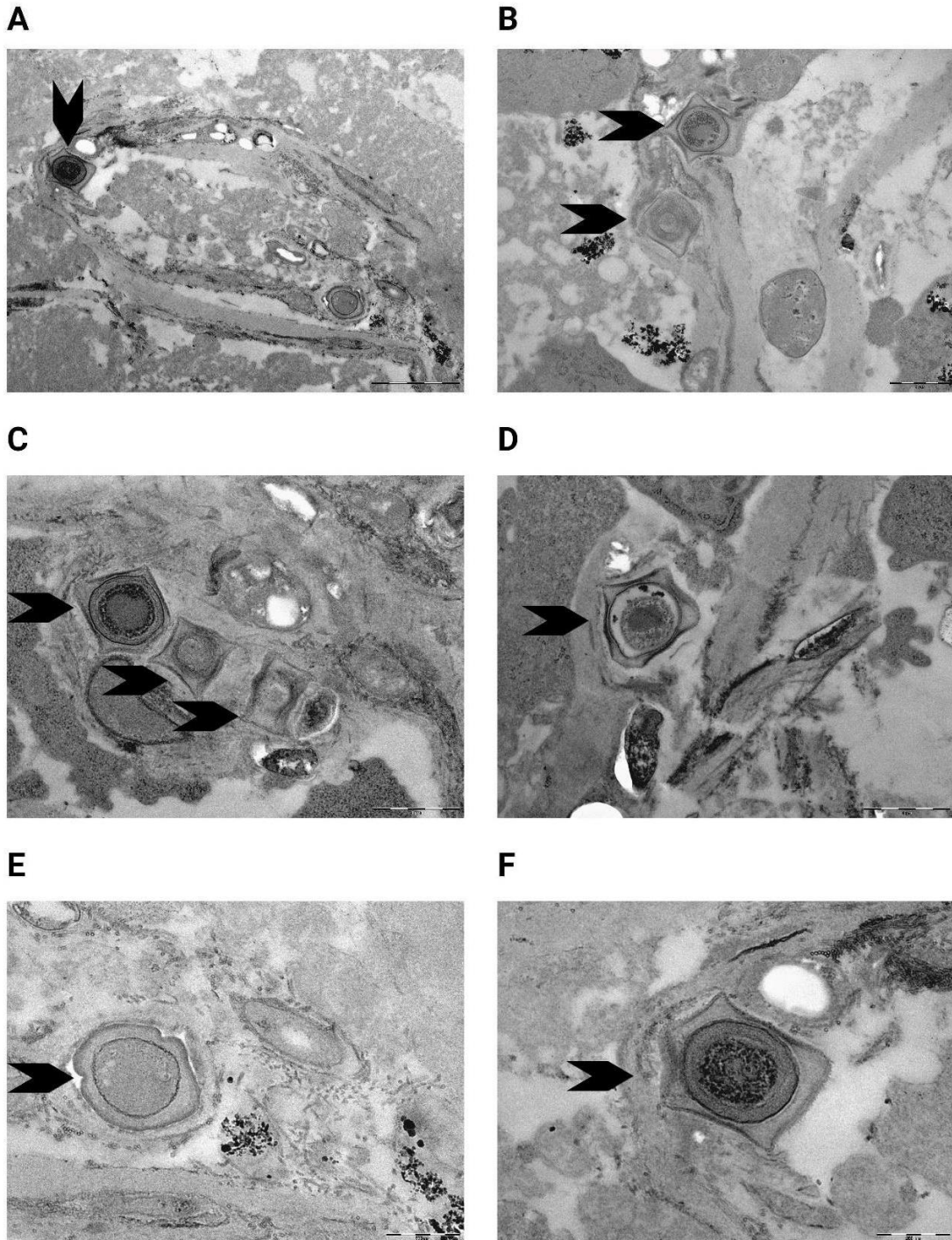


Células com citoplasma e núcleo bem definido foram observadas. Também foram claramente encontrados agregados de nanopartículas de óxido de ferro internalizados em estruturas vacuolares intracelulares. Partículas como as utilizadas neste trabalho foram identificadas previamente no meio extracelular, formando agregados adsorvidos nas membranas citoplasmáticas (BONFIM et al., 2019), mas sua ocorrência intracelular foi detectada em outros trabalhos (CALERO et al., 2014; FENG et al., 2018; HO et al., 2012; MATTIX et al., 2014; MAZUEL et

al., 2016). A entrada de nanopartículas de óxidos de ferro nas células acontece por vários fenômenos, no entanto dada a cobertura das nanopartículas deste estudo com longas cadeias de poli(L)lisina, conferindo-lhes potencial catiônico, é provável que sua internalização tenha ocorrido pela interação com proteoglicanas de superfície, tais como heparina e heparan sulfato e sulfatos de condroitina (RUEDA-GENSINI et al., 2020). Sua presença estimula a agregação das partículas, o que por sua vez estimula a endocitose de tais agregados (POON; GARIÉPY, 2007; SLOW et al., 2018). Ainda em relação à carga de superfície das partículas, há evidência relatando que a internalização de nanopartículas de óxido de ferro com carga positiva se concentra nas camadas corticais dos esferoides, aparentemente por interações eletrostáticas com proteínas da matriz extracelular (TCHORYK et al., 2019).

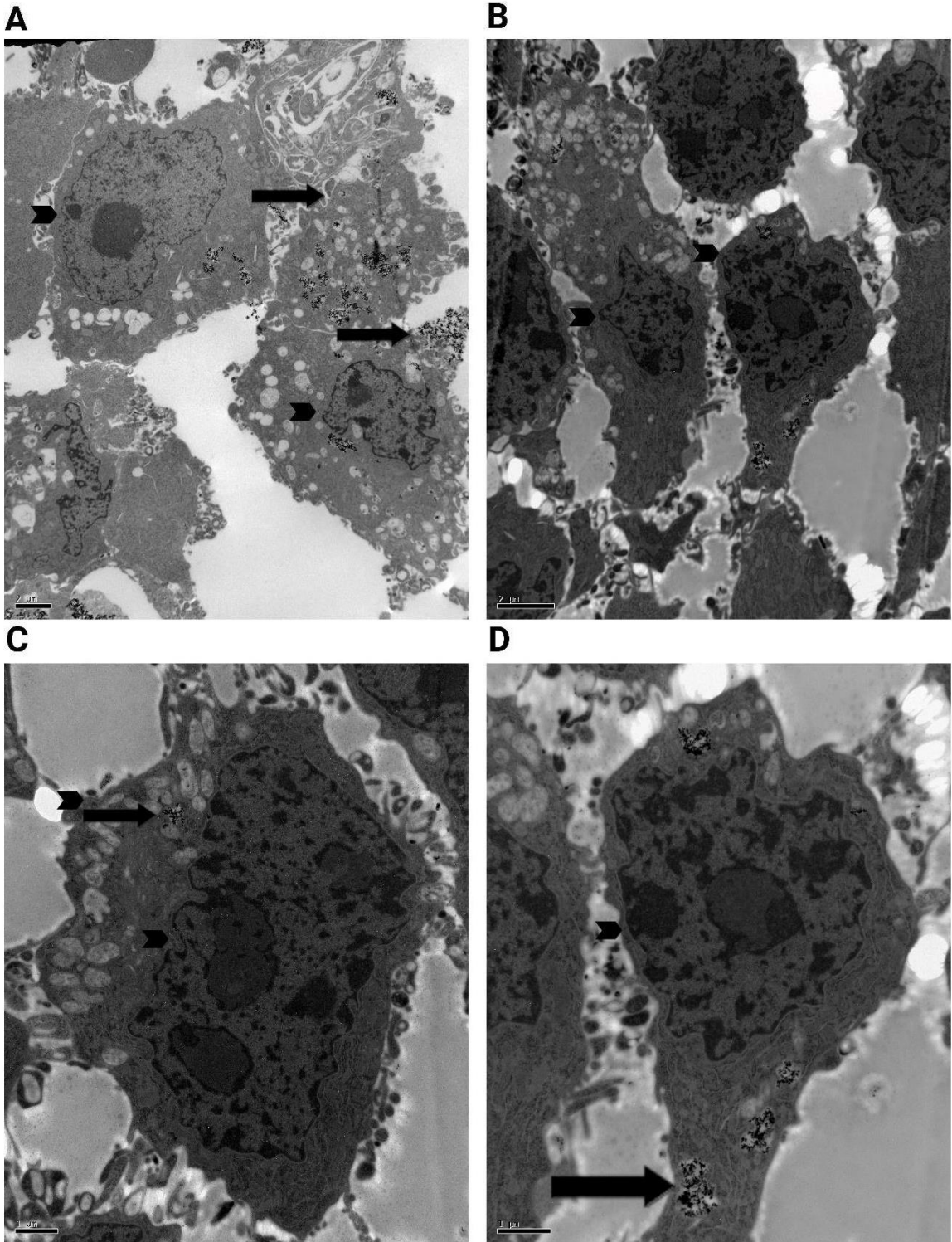
A ultraestrutura de esferoides de C2C12 infectados com taquizoítos de *T. gondii* $1,6 \times 10^4$ taquizoíto/poço está mostrada na Figura 12. Embora não conclusiva, a presença destes achados nos esferoides infectados, e sua completa ausência nos esferoides não infectados, leva à inferência de que são estruturas derivadas da presença intracelular do parasita. Após a internalização, o parasita é envolvido por um vacúolo parasitóforo (FERGUSON, 2009), saco multilamelar composto por componentes tanto do parasita quanto do hospedeiro (COPPENS et al., 2006). Os achados apresentam estrutura multilamelar, intracelular, e com agregações elétron-densas em seu interior, sugerindo a morfologia de vacúolos com taquizoítos únicos cortados transversalmente. A orientação dos tomos não privilegia a exibição das estruturas intracelulares do que se supõe que sejam taquizoítos, mas há ao menos uma referência de impacto na literatura mostrando achados semelhantes e em mesma orientação de corte (FERGUSON; DUBREMETZ, 2013). Após desenvolvimento dos processos de reprodução por endodiogenia, cerca de oito esporozoítos podem ser formados, os quais terão aparência de rosetas (BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008). O trabalho não conseguiu detectar tais estruturas, mas conforme relatado por Ferguson e Dubremetz (2013), os achados são próprios de vacúolos parasitóforos recém-formados, daí a presença de um único taquizoíto.

Figura 12 - Achados ultraestruturais observados em esferoides de C2C12 infectados com taquizoítos de *T. gondii*. Divisas: estruturas com morfologia compatível à de vacúolos parasitóforos. Aumentos: (A): 8900X; (B): 12500X; (C) e (D): 17500X; (E) e (F): 30000X.



Esferoides de células NIH/3T3 foram submetidos à análise por microscopia eletrônica de transmissão, e o seu aspecto geral está mostrado na Figura 13.

Figura 13 - Esferoides de células NIH/3T3 produzidos por levitação magnética observados por microscopia eletrônica de transmissão. Aumentos: (A): 5000X; (B): 8000X; (C): 12000X; (D): 15000X. Setas: agregados de nanopartículas de magnetita. Divisas: núcleos.

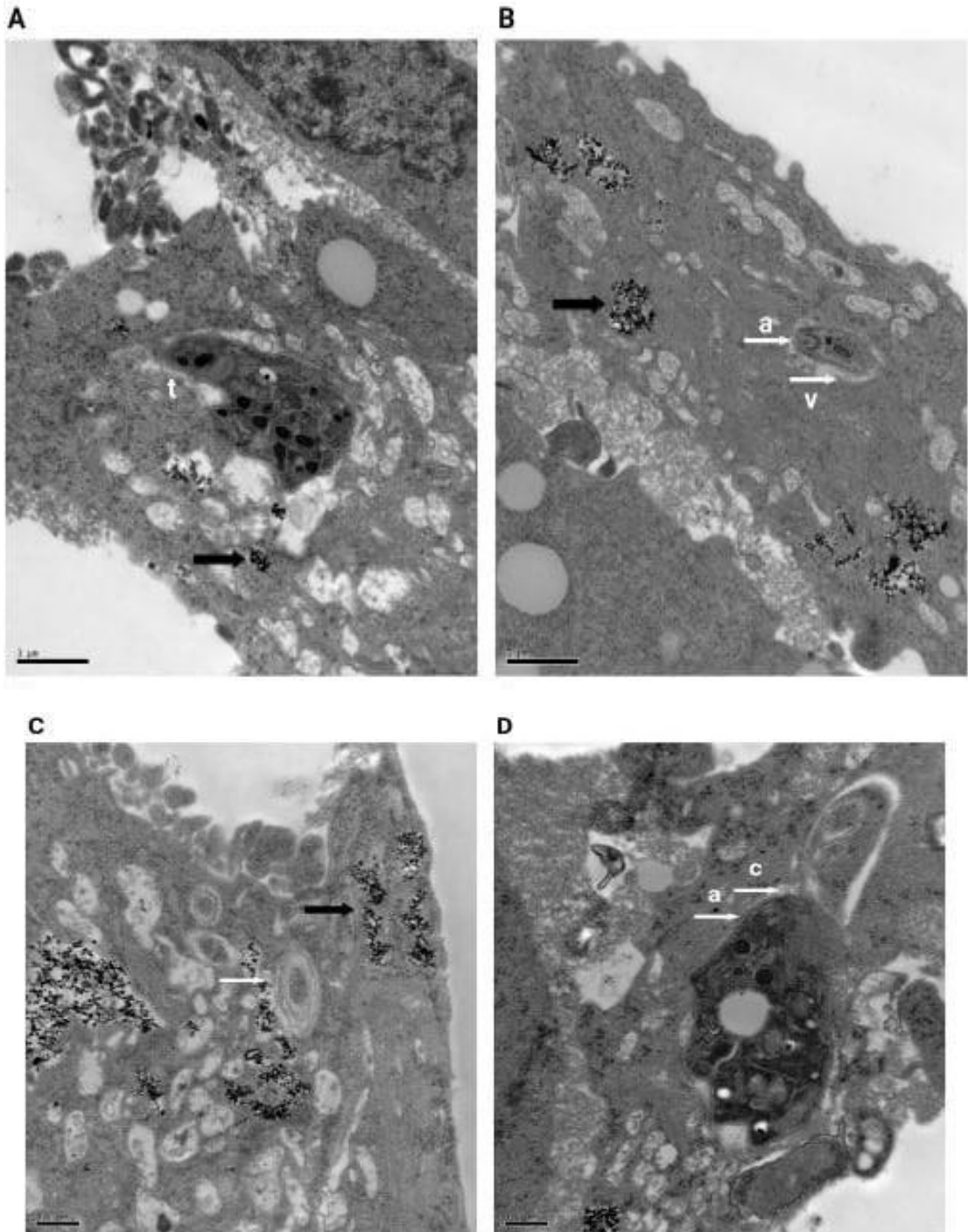


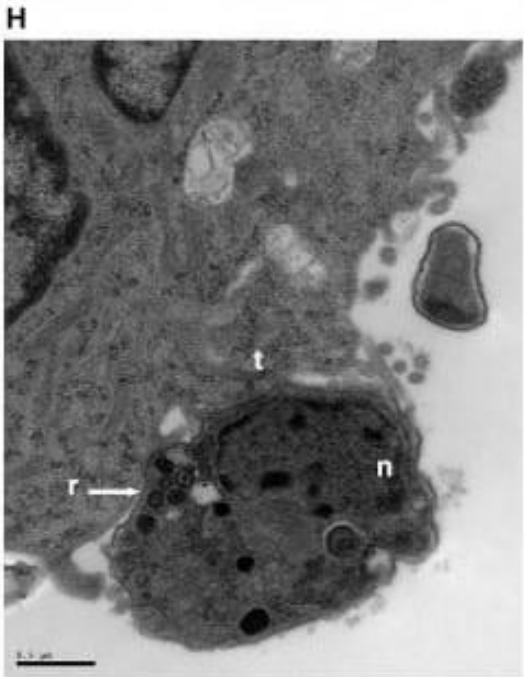
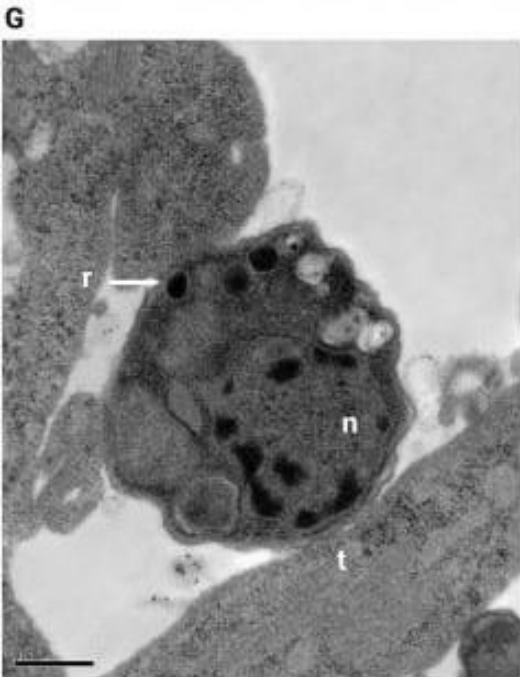
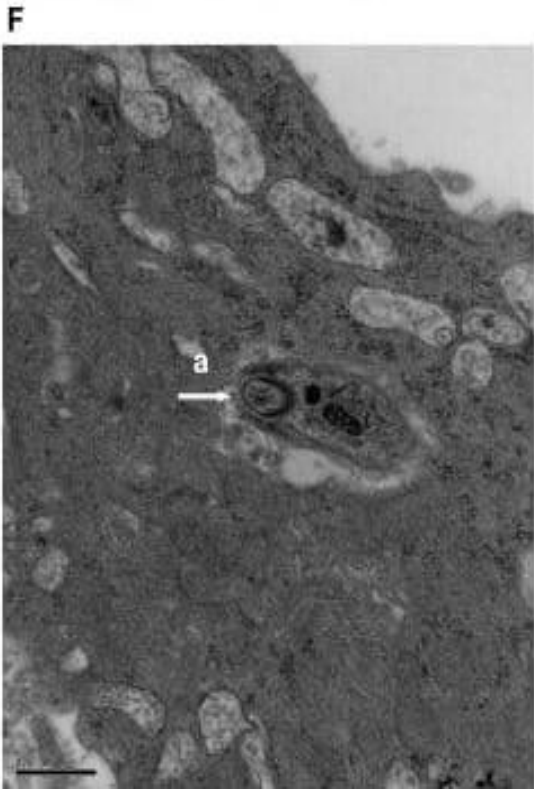
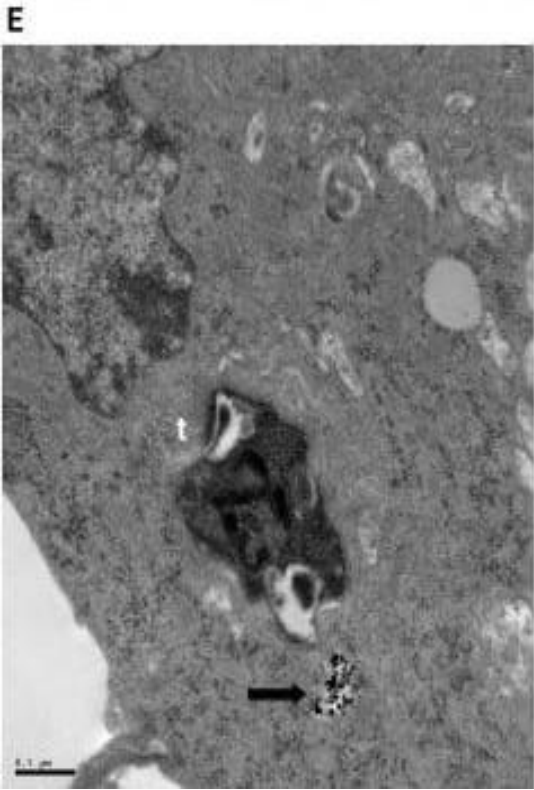
As células desta linhagem apresentaram-se com relação núcleo citoplasma diferente em relação às células da linhagem C2C12, com núcleos ligeiramente maiores, com morfologia compatível com os achados na literatura (DENARDIN et al., 2017; WISSEL et al., 2018). Foi possível observar também a

presença de agregados intracelulares elétron-densos, relacionados ao acúmulo intracelular de nanopartículas de magnetita.

Esferoides de células NIH/3T3 infectados com taquizoítos de *T. gondii* também foram avaliados, e apresentaram alguns achados peculiares mostrados na Figura 14. Estruturas com morfologia compatível com a de taquizoítos intracelulares foram encontradas, e o aspecto é bastante comparável com o de outros achados em trabalhos de outros grupos (DUBEY; LINDSAY, 1998; SEEBER; STEINFELDER, 2016; TOMAVO et al., 2013; ZENG et al., 2013). Foi possível inclusive observar estruturas do parasita como complexo apical e vacúolos parasitóforos (B, D e F), assim como uma estrutura coronal identificada como conóide do parasita. Achados com aparência próxima à dos achados em esferoides de C2C12 também foram identificados, remetendo à presença de vacúolos parasitóforos recentes. Achados em G e H foram classificados como taquizoítos associados a membrana citoplasmática das células em corte transversal, correlacionando a morfologia encontrada com outros achados na literatura (DUARTE et al., 2021; LIU et al., 2021; NISHI et al., 2021). Foi possível observar os núcleos dos parasitas e estruturas com morfologia relacionada à das roptrias.

Figura 14: Achados ultraestruturais observados em esferoides de 3T3 infectados com taquizoítos de *T. gondii*. Setas pretas: agregados intracelulares de nanopartículas de magnetita. (t): morfologia compatível com a de um taquizoíto intracelular de *T. gondii*. (a): estrutura morfolologicamente identificada como complexo apical de taquizoíto. (c): estrutura morfolologicamente identificada como conóide de taquizoíto. (v): estrutura morfolologicamente identificada como vacúolo parasitóforo. (n) núcleo do taquizoíto. (r): estrutura morfolologicamente identificada como roptria. Seta branca: estrutura morfolologicamente identificada como vacúolo parasitóforo com aparência similar à de esferoides células C2C12. Divisas: estruturas com morfologia compatível à de vacúolos parasitóforos. Detalhe do taquizoíto em (B) foi visualizado em maior aumento em (F). Aumentos: (A) e (B): 20000X; (C) e (D): 25000X; (E): 30000X; (F), (G) e (H): 40000X.

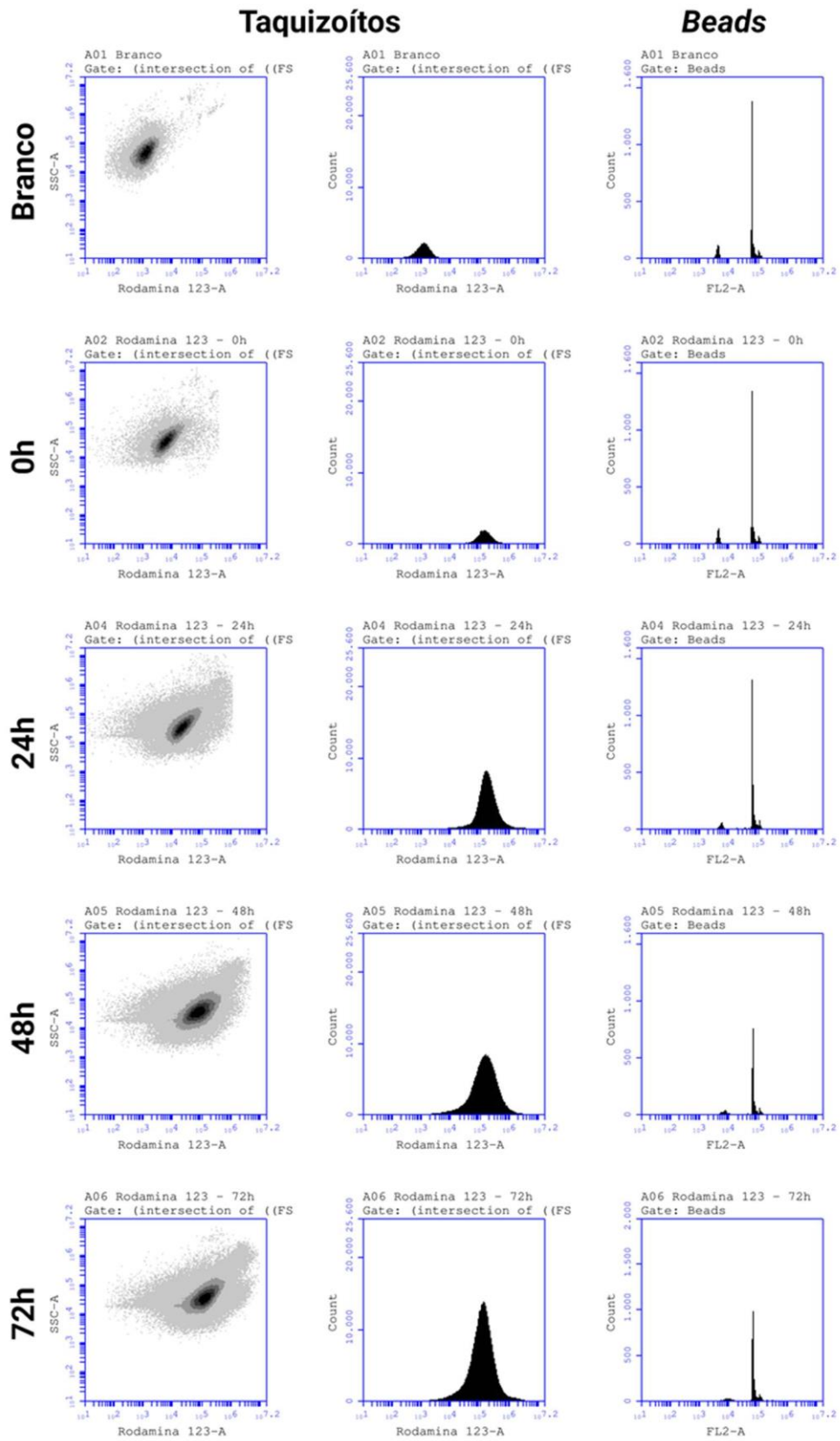




6.5 Avaliação da reprodução taquizoítos em esferoides de células NIH/3T3 por citometria de fluxo

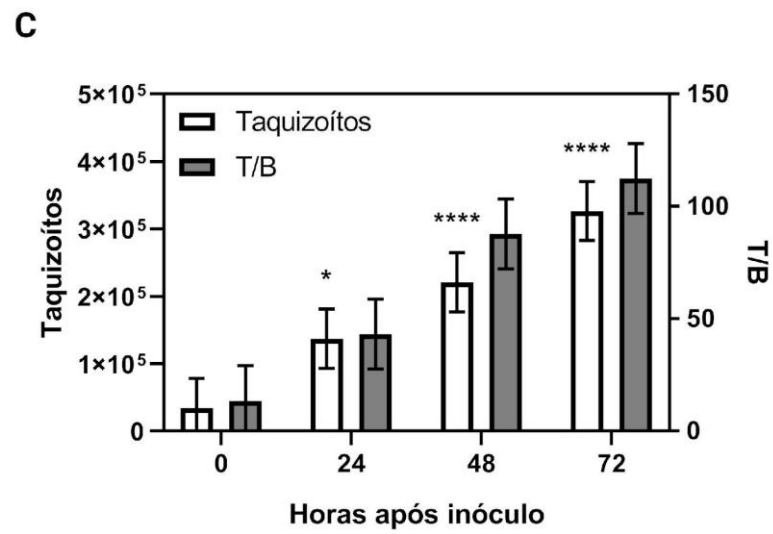
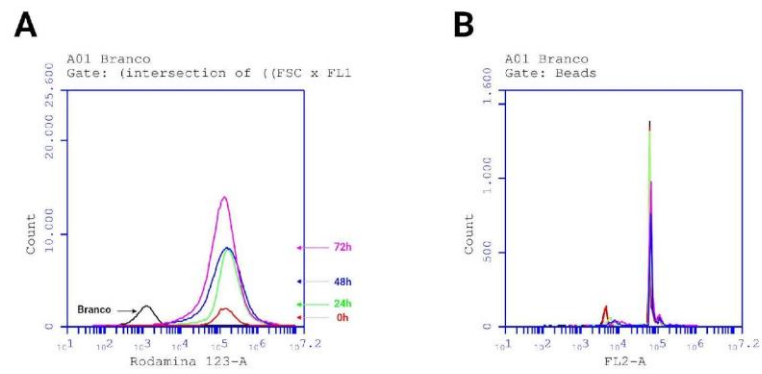
As populações de taquizoítos selecionadas por citometria de fluxo estão mostradas na Figura 15. Os taquizoítos captaram a Rodamina 123 de forma satisfatória, permitindo a discriminação de populações positivas e negativas. As populações de *beads* também foram facilmente discriminadas pela fluorescência captada por FL-2.

Figura 15 - Populações de taquizoítos marcados com Rodamina 123 e das *beads* adquiridas. A figura mostra as populações não marcadas (“branco”) e marcadas após 0, 24, 48 ou 72 horas após inóculo nos esferoides. Colunas esquerda e central: populações de taquizoítos adquiridas e mostradas em *dot plots* ou em histogramas, respectivamente. Coluna direita: populações de *beads* adquiridas.



A Figura 16 mostra as quantidades de taquizoítos, *beads* e a as proporções entre as duas populações adquiridas nos experimentos.

Figura 16: A - Histograma mostrando as populações de taquizoítos de *T. gondii* adquiridas pelo equipamento após incubações por 0 (vermelho), 24 (verde), 48 (azul) e 72 (magenta) horas com os esferoides de fibroblastos. O histograma em preto representa amostra controle de taquizoítos viáveis mas não-marcada por Rodamina 123. B - populações de *beads* seguindo o mesmo código de cores. C - gráfico em barras mostrando as quantidades de taquizoítos (barras brancas; eixo esquerdo) e a proporção entre taquizoítos e *beads* (T/B, barras cinzas, eixo direito). Barras de erro: média do erro padrão. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle (0h de incubação). (*): $p < 0,05$. (****): $p < 0,0001$. D - tabela com os valores obtidos nas aquisições.



D

	Taqizooitos	Beads	T/B
0h	34198	2543	13,45
24h	137082	3178	43,13
48h	220543	2514	87,73
72h	326423	2904	112,4

As quantidades de taquizoítos, *beads* e a proporção T/B foram comparadas por análise de variância em uma via (“One-way ANOVA”) e pós-teste segundo Dunnett. Há expressivo aumento da quantidade de taquizoítos ao longo da duração do experimento; sua população salta mais de 9 vezes em 72 horas de incubação, e tal diferença em relação ao início do experimento (0h) é estatisticamente significativa de maneira bem expressiva ($p < 0,0001$).

As quantidades de *beads* adquiridas variaram pouco, com coeficiente de variação entre as amostras de 11,37%. Assim, foram utilizadas como linha de base de cálculo (ou como calibradores de quantificação) de quantidades relativas de taquizoítos. No entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os valores de T/B calculados para as amostras.

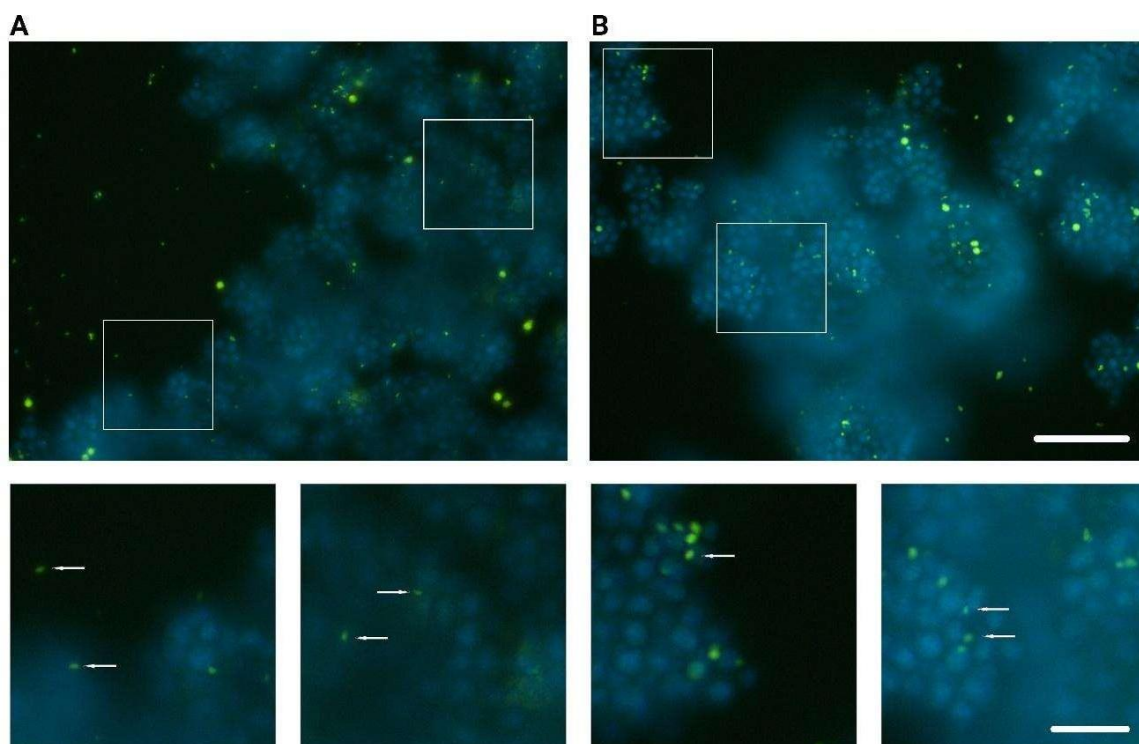
Desta forma, foi possível de certa forma apoiar a hipótese de que o parasita pode sustentar seu ciclo reprodutivo, dividindo-se e aumentando sua população utilizando os esferoides de NIH-3T3 como substrato, ao menos durante as 72 horas de duração do experimento.

6.6 Detecção de taquizoítos por análise de microscopia

Taquizoítos provenientes de lavados intraperitoneais recém-corados por Rodamina 123 foram usados como inóculo em esferoides de células NIH/3T3 coradas com Hoechst 33242. O aspecto do material está mostrado na Figura 17.

Figura 17 - Esferoides de NIH/3T3 inoculados com taquizoítos de *T. gondii* e avaliados por microscopia de fluorescência 30 (A) ou 60 minutos (B) após inóculo. Azul: núcleos das células marcados com Hoechst 332412. Verde: taquizoítos de *T.*

gondii marcados com Rodamina 123A, destacados por setas brancas. Aumento: 10X (destaque: 24X, digital). Barras: 100µm.



As mitocôndrias dos taquizoítos foram marcadas com sucesso pela Rodamina 123, conferindo-lhes a fluorescência verde, conforme relatos anteriores (DE MELO, E. J. T. et al., 1992; SOUZA; BELFORT JR., 2014; TANABE, 1985). A Figura mostra objetos de formato fusiforme e tamanho pequeno em relação às células, perfeitamente compatível com os avistamentos de taquizoítos de *T. gondii* em cultura. também artefatos com dimensões maiores do que as encontradas nos taquizoítos, e sua ocorrência foi relacionada à presença de material de origem murina na suspensão utilizada, uma vez que foram empregados camundongos para a reprodução da cepa na etapa anterior ao inóculo *in vitro*. Tais eventos espúrios desaparecem do cultivo após cerca de 24 horas após o inóculo (dados não mostrados), e não houve evidência de interferência no experimento, embora sua presença seja indesejável e deve ser removida por filtração em experimentos futuros.

A coloração apresentada é sugestiva de viabilidade, porque as células em sua maioria estão apresentando a cor azul. Em verde podemos observar os

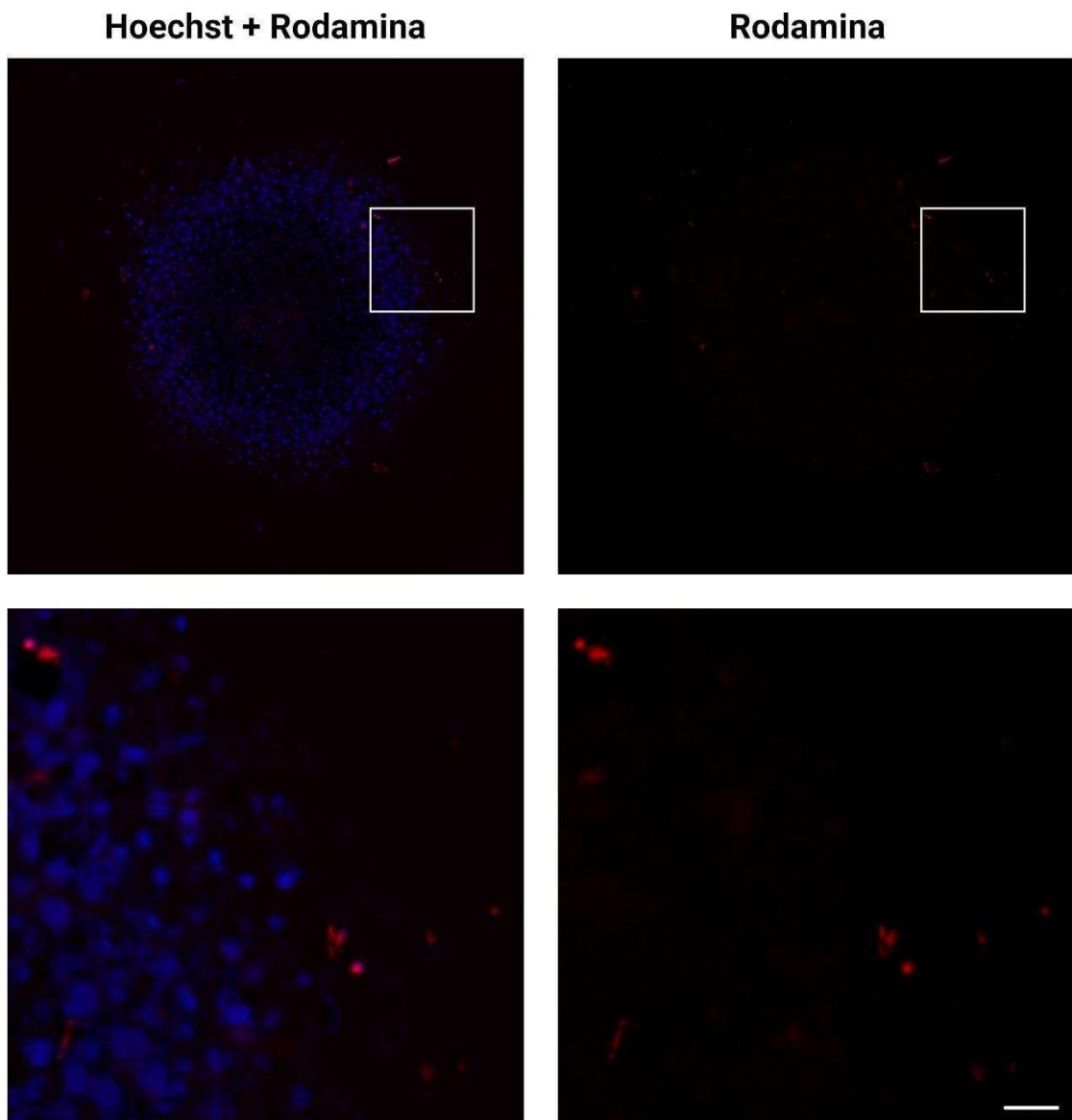
taquizoítos marcados com a R123. As mitocôndrias da célula hospedeira acumulam-se no vacúolo parasitóforo (PV), no qual o parasita cresce e se multiplica, circundando sua superfície. Em pH fisiológico, R123 se acumula seletivamente em mitocôndrias e o acúmulo específico parece resultar de um alto potencial transmembranar (negativo interno) atravessa a membrana mitocondrial.

A funcionalidade das mitocôndria é influenciada pela morfologia. Essas mudanças morfológicas aumentam a eficiência da β -oxidação, aumentando a associação mitocondrial com e a absorção de ácidos graxos (AGs) e de gotículas lipídicas (GLs), um exemplo, são os sinais citosólicos que podem interferir na fissão, fusão e remodelação das cristas. No momento da fome as mitocôndrias se alongam e sua superfície de cristas aumentam, para evitar a degradação autofágica (AGs e GLs sofrem lipofagia) (PERNAS et al., 2018). O *Toxoplasma gondii* se associa da lipofagia da célula hospedeira para obter AGs necessários para sua proliferação. As mitocôndrias hospedeiras se fundem em torno do vacúolo do parasita. A infecção por *T. gondii* desencadeia a autofagia das gotículas de lipídios (GLs) que armazenam os AGs, essas gotículas lipídicas durante a infecção se transformam em adipócitos devido a sua redução. O *T. gondii* induz autofagia em fibroblastos cuja população GLs está esgotada nos estágios finais da infecção. Essa afirmação pode ser observada, por meio das imagens de MET, que demonstram hipersinal que sugerem ser lipídios que sofreram lipofagia.

Após a confirmação da marcação de taquizoítos, os esferoides foram observados no equipamento INCell Analyzer 2500HS. A Figura 18 mostra o aspecto do mesmo esferoide 0,5, 2, 4 e 24 horas após o inóculo. As stacks adquiridas foram tratadas usando novamente o software Fiji com o plugin "Extended Depth of Field" (FORSTER et al., 2004) para ajuste de foco dos planos adquiridos. Apesar da presença de artefatos, foi possível identificar estruturas com morfologia compatível com a de taquizoítos livres.

A Figura 19 mostra em detalhes imagens do mesmo esferoide 24 horas após o inóculo.

Figura 18 - Esferoide de NIH/3T3 inoculados com taquizoítos de *T. gondii* e avaliado por microscopia de fluorescência 24 horas após inóculo. Azul: núcleos das células marcados com Hoechst 332412. Vermelho: taquizoítos de *T. gondii* marcados com Rodamina 123A. Aumentos - Acima: 10X; Abaixo: 30X (digital). Barra: 33 μ m.



A ocorrência de taquizoítos foi percebida visualmente de maneira discreta devido à penetração deficitária da luz em corpos extensos, limitando a resolução do equipamento. No entanto, foi possível inferir ocorrência de taquizoítos não no interior do esferoide, mas em sua periferia, compondo de certa forma uma espécie de epifauna tendo o esferoide como substrato físico. Ensaios preliminares

mostraram que houve distribuição homogênea de células vivas e inviáveis nos esferoides utilizados, de forma a não ter sido observado um efeito de viabilidade celular predominantemente cortical e mortalidade internalizada nos esferoides, sendo este um efeito comum e observável neste sistema de cultivo *in vitro* (HARI et al., 2019; KHAITAN et al., 2006; LEWIN et al., 2020; SATO et al., 2015; ŠTAMPAR et al., 2020). Assim, a ocorrência de camada celular externa com taxa de proliferação acelerada não poderia explicar a aparente preferência dos taquizoítos pela periferia dos esferoides. É possível associar este comportamento à simples disponibilidade de gases e nutrientes, que é maior na superfície, e nas concentrações de excretas, maiores no interior dos esferoides (BARISAM et al., 2018; GOMES et al., 2018; HAN et al., 2021; JAMIESON et al., 2015) , atraindo assim os taquizoítos a ambientes menos agressivos. Estes possuem quimiotaxia positiva a vários aminoácidos, colesterol, poliaminas e ferro (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008), elementos presentes no meio de cultura e portanto, em quantidades maiores no meio extracelular, o que pode ter mantido os taquizoítos na epifauna. Os mecanismos moleculares da quimiotaxia de taquizoítos são extensos, descritos em outros trabalhos (BLUME; SEEBER, 2018; LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008) e ultrapassam o escopo deste trabalho, não tendo sido abordados em profundidade.

Para ampliar a capacidade de detecção, foram geradas projeções rotacionais no eixo y em 3D de cada stack contendo os taquizoítos encontrados foram geradas pelo pacote Fiji (<https://imagej.net/software/fiji/>) (SCHINDELIN et al., 2012) utilizando o comando “3D Objects Counter” (<https://imagej.net/plugins/3d-objects-counter>) e gerando sequências de imagens renderizadas após o comando “Stacks → 3D Project”. A Figura 20 mostra o aspecto típico de uma análise utilizando um esferoide infectado por *T. gondii*, evidenciando os taquizoítos detectados pela metodologia.

Figura 19 - Aspecto típico de esferoide infectado por taquizoítos de *T. gondii*. A renderização obtida foi rotacionada y em vários ângulos para facilitar a visualização dos taquizoítos. Núcleos de células NIH/3T3 e taquizoítos encontrados estão representados em azul e vermelho, respectivamente (pseudocor). Coluna esquerda: Visualização do esferoide em ângulo perpendicular (0°), e em rotações de 30° , 60° e 90° . Aumento: 10X (óptico). Barra: $100\mu\text{m}$. Coluna direita: ampliação dos destaques da coluna esquerda. Aumento: 68X (digital). Barra: $15\mu\text{m}$.

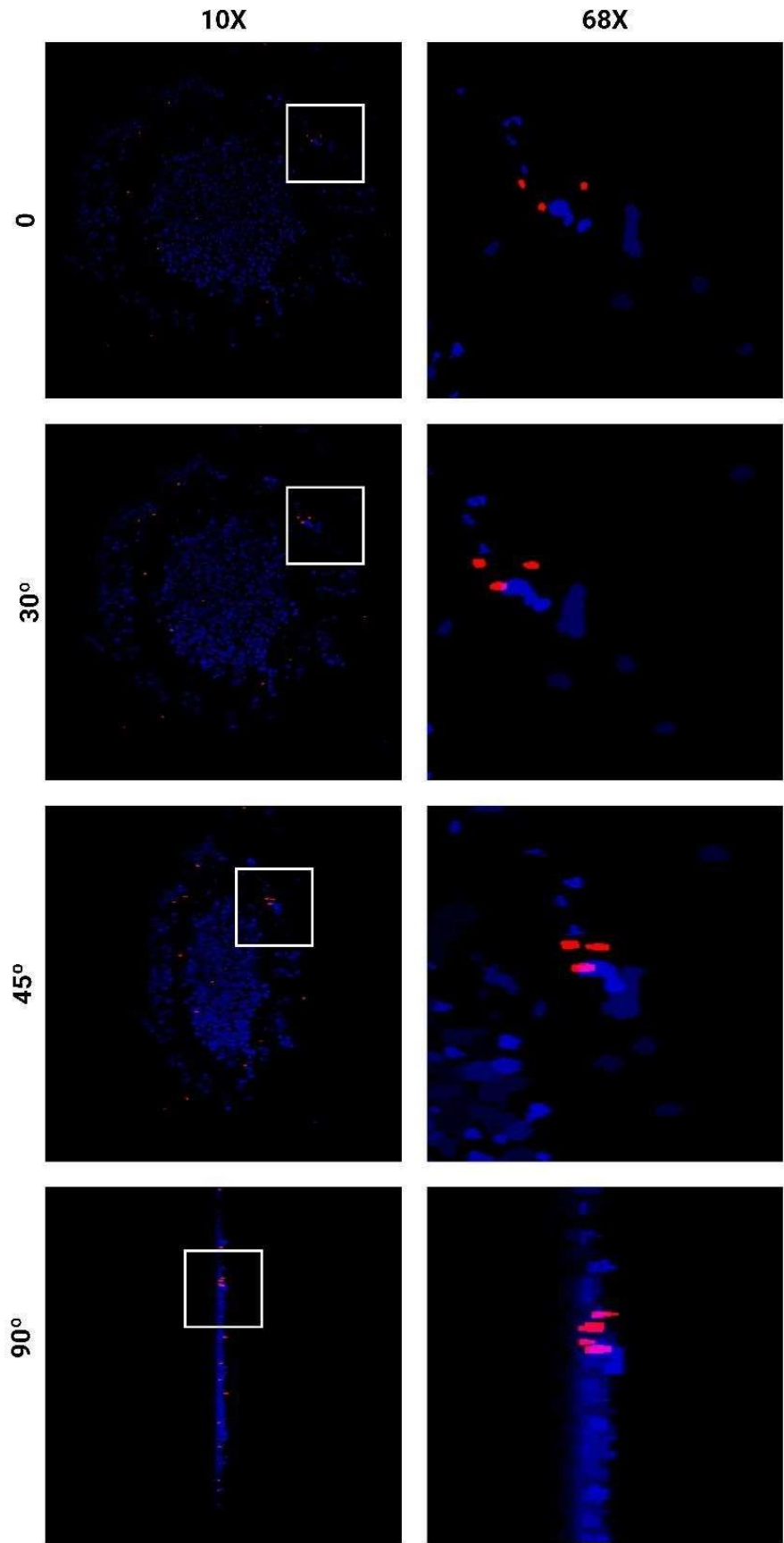
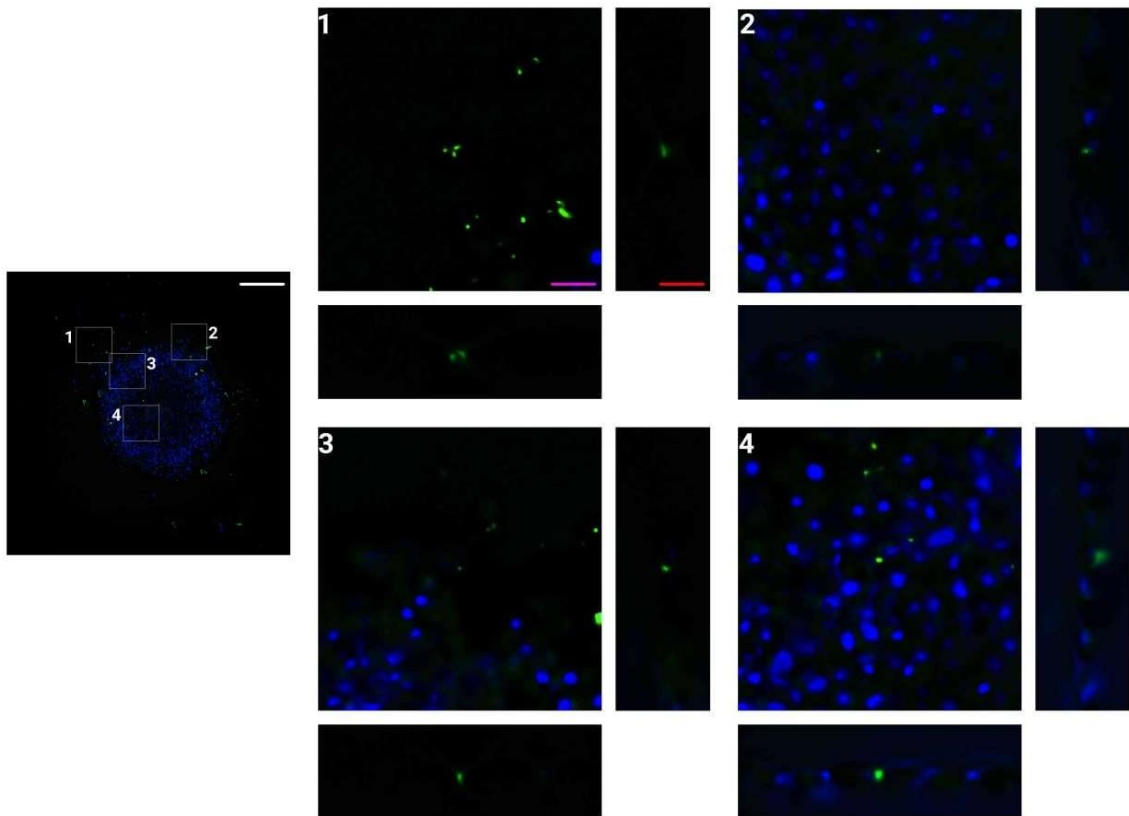
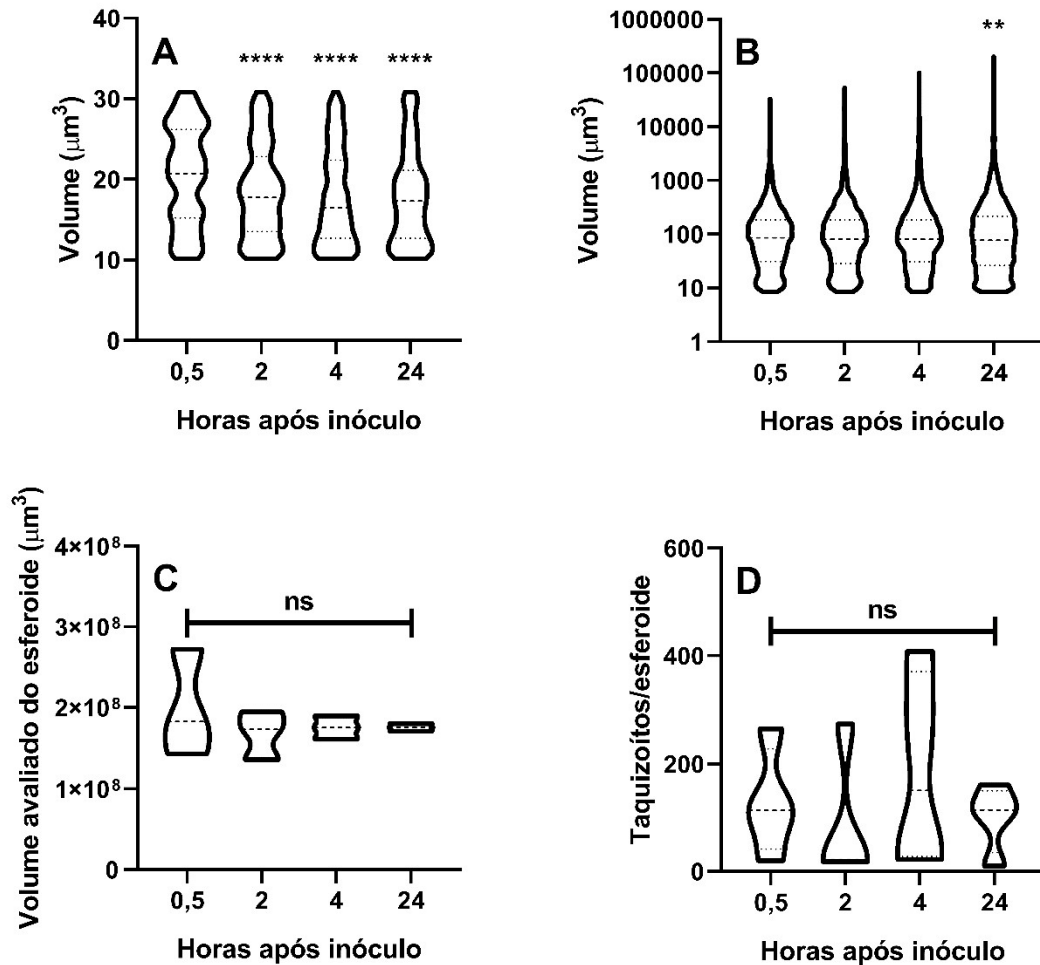


Figura 20- Eventos positivos para rodamina 123 no esferóide 24 horas após a infecção. Esquerda: Esferóides inteiro e quatro regiões de interesse destacadas contendo eventos relevantes. Ampliação: 4X. Barra de escala (branca): 200 μ m. (1), (2), (3) e (4): Zoom digital (16X) das regiões destacadas e suas respectivas vistas ortogonais (YZ e XZ). Barras de escala: 50 μ m (magenta) e 5 μ m (vermelho). Eventos pseudocoloridos: azul – núcleos NIH/3T3 (Hoechst 33342); verde – taquizoítos de *T. gondii* (Rodamine 123).



Foram analisadas *stacks* de esferóides de NIH/3T3 0,5, 2, 4 e 24 horas após o inóculo com taquizoítos de *T. gondii*. O volume dos taquizoítos encontrados, dos núcleos de NIH/3T3, dos esferóides e o número de taquizoítos foram avaliados pelo *software* INCarta e estão mostrados na Figura 21

Figura 21 – A proporção de núcleo de célula por taquizoítos foi correlacionada com o tempo de infecção que demonstrou queda após 4 horas.



Conforme literatura recente (FIRDAUS et al., 2020), é esperado aumento do volume de células de mamíferos após a infecção *in vitro* por taquizoítos de *T. gondii*. O presente estudo pode observar um aumento no volume dos núcleos das células NIH/3T3 24 horas após a infecção, período em que teoricamente mais de um ciclo de divisão do parasita pode ter se passado (RADKE et al., 2001). A proteína GRA16 do parasita pode ser translocada aos núcleos das células do hospedeiro, levando a alterações no perfil de expressão gênica e níveis de transcrição (BOUGDOUR et al., 2013). Além disso, a infecção por *T. gondii* induz paralisação do ciclo celular entre a fase S e a fase G2/M, induzindo o aumento de células com conjunto genômico maior que 2n, o que poderia ao menos em parte explicar o aumento de volume nuclear (VELÁSQUEZ et al., 2019). Já a redução de volume do parasita não pode ser explicada pelos presentes experimentos nem por análise da bibliografia, sendo provavelmente o primeiro relato na literatura.

O volume total dos esferoides não se alterou durante o experimento, nem o número de taquizoítos na epifauna. No entanto, os dados de citometria de fluxo mostraram aumento bastante significativo do número de taquizoítos coletados no meio de cultura, corroborando de certa forma o caráter livre-natante do parasita. Experimentos futuros seriam necessários para mostrar se os taquizoítos da epifauna seriam parasitas que, ou estariam prestes a invadir uma célula hospedeira, ou acabaram de romper a membrana e libertar-se ao meio. Todas as atividades entre estes dois marcos temporais do ciclo do parasita em cultura teriam sido cumpridos de maneira livre no meio de cultura.

7. CONCLUSÃO

O trabalho é um dos primeiros a relatar cultivo de *T. gondii* em modelo de cultivo tridimensional e até o momento o único que relata cultivo em esferoides, e não apenas em células dispersas em matriz extracelular.

Os dados mostraram que é possível replicar taquizoítos utilizando os PION's (nanopartículas de óxido de ferro biofuncionalizadas) nas culturas celulares.

O modelo proposto fornece uma base experimental capaz de elucidar preferências do parasita por tipos celulares específicos, efeito do pH e das quantidades de nutrientes na infecção, necessitando poucos refinamentos.

O cultivo celular tridimensional se torna uma ferramenta que possibilita estudos de profundidade dos tecidos que estariam sujeitas à invasão, e até mesmo um possível modelo de cultivo de bradizoítos e seus cistos, cujas técnicas ainda precisam de aperfeiçoamento.

Os resultados obtidos por imagem computacional contribuem para o estudo do *Toxoplasma gondii*.

A microscopia por fluorescência e a citometria de fluxo mostraram-se metodologias importantes para avaliar a infecção em células e a proliferação parasitária.

A técnica possibilitou a abertura de um novo horizonte de cultivo *in vitro* que poderia almejar a eliminação do uso de animais para manutenção das cepas, bastando aos laboratórios apenas coletarem o meio de cultura com parasitas e utilizar as suspensões para reinfestar novos esferoides em cultura.

Os esferoides possuem um microambiente favorável a reprodução do taquizoíto e com maior reprodutibilidade. Se torna mais vantajoso por ser seguro biologicamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, M.; SOOD, A.; GUPTA, J. Toxoplasmosis in pregnancy. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, v. 255, p. 44-50, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.10.003>
- ATTIAS, M.; VOMMARO, R. C.; DE SOUZA, W. A Organização Estrutural de *Toxoplasma gondii*. In: DE SOUZA, W.; BELFORT JR., R. *Toxoplasmosose & Toxoplasma gondii*. [S.l.]: SciELO Books, 2014. Cap. 3. v. 1. p. 47-60.
- BARISAM, M.; SAIDI, M. S.; KASHANINEJAD, N.; NGUYEN, N. T. Prediction of necrotic core and hypoxic zone of multicellular spheroids in a microbioreactor with a U-shaped barrier. *Micromachines*, v. 9, n. 3, p. 1-19, 2018.
- BLUME, M.; SEEBER, F. Metabolic interactions between *Toxoplasma gondii* and its host [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research*, v. 7, n. 0, p. 1-10, 2018.
- BONFIM, L.; PASSOS, P. Q. S.; GONÇALVES, K. O.; COURROL, L. C.; SILVA, F. R. O.; VIEIRA, D. P. Microwave-mediated synthesis of iron-oxide nanoparticles for use in magnetic levitation cell cultures. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, v. 9, n. 8, p. 1707-1717, 2019.
- BOOTHROYD, J. C.; DUBREMETZ, J. F. Kiss and spit: The dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, n. 1, p. 79-88, 2008.
- BOUGDOUR, A.; DURANDAU, E.; BRENIER-PINCHART, M. P.; ORTET, P.; BARAKAT, M.; KIEFFER, S.; CURT-VARESANO, A.; CURT-BERTINI, R. L.; BASTIEN, O.; COUTE, Y.; PELLOUX, H.; HAKIMI, M. A. Host cell subversion by *Toxoplasma* GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. *Cell Host and Microbe*, v. 13, n. 4, p. 489-500, 2013.
- CALERO, M.; GUTIÉRREZ, L.; SALAS, G.; LUENGO, Y.; LÁZARO, A.; ACEDO, P.; MORALES, M. P.; MIRANDA, R.; VILLANUEVA, A. Efficient and safe internalization of magnetic iron oxide nanoparticles: Two fundamental requirements for biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 10, n. 4, p. 733-743, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2013.11.010>
- CHRISTIANSEN, C.; MAUS, D.; MELEROWICZ, F.; SCHOLZ, J.; MURILLO-LEÓN, M.; STEINFELDT, T.; HOFFMANN, T.; SEEBER, F.; BLUME, M. A Novel in vitro Model for Mature *Toxoplasma gondii* Bradyzoites Reveals their Metabolome and a Diminished Role

of the Mitochondrial Tricarboxylic Acid Cycle. *bioRxiv*, p. 2021.01.15.426845, 2021.

Disponível

em:

<https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2021/01/16/2021.01.15.426845.full.pdf>

CLIFFORD, D. C.; CASTANO, C. E.; ROJAS, J. V. Supported transition metal nanomaterials: Nanocomposites synthesized by ionizing radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 132, n. November 2016, p. 52-64, 2017.

CONTERA, S.; DE LA SERNA, J. B.; TETLEY, T. D. Biotechnology, nanotechnology and medicine. *Emerging Topics in Life Sciences*, v. 4, n. 6, p. 551-554, 2021.

COPPENS, I.; DUNN, J. D.; ROMANO, J. D.; PYPART, M.; ZHANG, H.; BOOTHROYD, J. C.; JOINER, K. A. Toxoplasma gondii Sequesters Lysosomes from Mammalian Hosts in the Vacuolar Space. *Cell*, v. 125, n. 2, p. 261-274, 2006.

ČUBOVÁ, K.; ČUBA, V. Synthesis of inorganic nanoparticles by ionizing radiation – a review. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 169, n. February 2019, p. 108774, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2020.108774>

DANIELSON, J. J.; PEREZ, N.; ROMANO, J. D.; COPPENS, I. Modelling Toxoplasma gondii infection in a 3D cell culture system In Vitro: Comparison with infection in 2D cell monolayers. *PLoS ONE*, v. 13, n. 12, p. 1-13, 2018.

DE MELO, E. J. T.; DE CARVALHO, T. U.; DE SOUZA, W. Penetration of Toxoplasma gondii into Host Cells Induces Changes in the Distribution of the Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum. *Cell Structure and Function*, v. 17, n. 5, p. 311-317, 1992.

DEDA, D. K.; CARDOSO, R. M.; UCHIYAMA, M. K.; PAVANI, C.; TOMA, S. H.; BAPTISTA, M. S.; ARAKI, K. A reliable protocol for colorimetric determination of iron oxide nanoparticle uptake by cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 409, n. 28, p. 6663-6675, 2017.

DENARDIN, C. C.; MARTINS, L. A. M.; PARISI, M. M.; VIEIRA, M. Q.; TERRA, S. R.; BARBÉ-TUANA, F. M.; BOROJEVIC, R.; VIZZOTTO, M.; EMANUELLI, T.; GUMA, F. C. R. Autophagy induced by purple pitanga (Eugenia uniflora L.) extract triggered a cooperative effect on inducing the hepatic stellate cell death. *Cell Biology and Toxicology*, v. 33, n. 2, p. 197-206, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10565-016-9366-5>

DESMETTRE, T. Toxoplasmosis and behavioural changes. *Journal Francais d'Ophtalmologie*, v. 43, n. 3, p. e89-e93, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2020.01.001>

DEWJI, S. A. Ionizing Radiation: Discovery and Dose Quantities. *Encyclopedia of Nuclear Energy*, p. 701-715, 1 jan. 2021.

DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O.; DUPOUY-CAMET, J.; VAN DER GIESSEN, J.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: Overview from a One Health perspective. *Food and Waterborne Parasitology*, v. 15, p. 12-15, 2019.

DUARTE, A. G. P.; CARVALHO, G. O. A. M. De; FRANZEN, A. J.; JUNIOR, A. H.; FERNANDES, C.; FORTES, F. da S. de A.; SEABRA, S. H. Anti-Toxoplasma Gondii Effect of Metalocomplex Compounds N0414 and N5814 / Efeito Anti-Toxoplasma Gondii Do Composto Metalocomplexo N0414 E N5814. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 2, p. 16541-16555, 2021.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. Structures of Toxoplasma gondii Tachyzoites , Bradyzoites , and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts †. v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

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 Reviews*, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

EL-BAHY, M. M.; KHALIFA, M. M.; MÉABED, E. M. H. Toxoplasma gondii: Prolonged in-vitro maintenance of virulent tachyzoites in fluid media at low temperatures . *Alexandria Journal of Medicine*, v. 54, n. 4, p. 511-515, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2018.10.006>

FENG, Q.; LIU, Y.; HUANG, J.; CHEN, K.; HUANG, J.; XIAO, K. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19628-z>

FERGUSON, D. J. P. Toxoplasma gondii: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 2, p. 133-148, 2009.

FERGUSON, D. J. P.; DUBREMETZ, J. F. *The Ultrastructure of Toxoplasma gondii*. Second Edi, [S.l.]: Elsevier, 2013. 19-59 p. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-396481-6.00002-7>

FIRDAUS, E. R.; PARK, J. H.; LEE, S. K.; PARK, Y. K.; CHA, G. H.; HAN, E. T. 3D morphological and biophysical changes in a single tachyzoite and its infected cells using three-dimensional quantitative phase imaging. *Journal of Biophotonics*, v. 13, n. 8, , 2020.

FORSTER, B.; VAN DE VILLE, D.; BERENT, J.; SAGE, D.; UNSER, M. Complex wavelets for extended depth-of-field: A new method for the fusion of multichannel microscopy images. *Microscopy Research and Technique*, v. 65, n. 1-2, p. 33-42, 2004.

GOMES, A.; DEFAUX, M.; LEMEE, R. M.; LOBJOIS, V.; DUCOMMUN, B. Reversible growth arrest of 3D tumor spheroids stored in oxygen absorber-induced anoxia. *Oncology Letters*, v. 15, n. 2, p. 2006-2009, 2018.

HAN, S. J.; KWON, S.; KIM, K. S. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell International*, v. 21, n. 1, p. 1-19, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01853-8>

HARI, N.; PATEL, P.; ROSS, J.; HICKS, K.; VANHOLSBEECK, F. Optical coherence tomography complements confocal microscopy for investigation of multicellular tumour spheroids. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

HARMER, C.; ASPÖCK, H.; HASSL, A. Toxoplasma gondii in vitro cultivation: easy handling long-term propagation. *Journal of Microbiological Methods*, v. 27, n. 2-3, p. 221-223, nov. 1996. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701296009529>

HO, D. N.; KOHLER, N.; SIGDEL, A.; KALLURI, R.; MORGAN, J. R.; XU, C.; SUN, S. Penetration of endothelial cell coated multicellular tumor spheroids by iron oxide nanoparticles. *Theranostics*, v. 2, n. 1, p. 66-75, 2012.

JAMIESON, L. E.; HARRISON, D. J.; CAMPBELL, C. J. Chemical analysis of multicellular tumour spheroids. *Analyst*, v. 140, n. 12, p. 3910-3920, 2015.

JENSEN, C.; TENG, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? v. 7, n. March, p. 1-15, 2020.

KHAITAN, D.; CHANDNA, S.; ARYA, M. B.; DWARAKANATH, B. S. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; implications for tumor therapy. *Journal of Translational Medicine*, v. 4, p. 1-13, 2006.

KOCHANOWSKY, J. A.; KOSHY, A. A. Toxoplasma gondii. *Current Biology*, v. 28, n. 14, p. R770-R771, 2018.

LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V. B. Host cell manipulation by the human pathogen Toxoplasma gondii. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, n. 12, p. 1900-1915, 2008.

LEWIN, T. D.; MAINI, P. K.; MOROS, E. G.; ENDERLING, H.; BYRNE, H. M. A three phase model to investigate the effects of dead material on the growth of avascular tumours. **Mathematical Modelling of Natural Phenomena**, v. 15, p. 22, 18 mar. 2020. Disponível em: <https://www.mmnp-journal.org/10.1051/mmnp/2019039>

LIU, Y.; TANG, Y.; TANG, X.; WU, M.; HOU, S.; LIU, X.; LI, J.; DENG, M.; HUANG, S.; JIANG, L. Anti-Toxoplasma gondii Effects of a Novel Spider Peptide XYP1 In Vitro and In Vivo. **Biomedicines**, v. 9, n. 8, p. 934, 1 ago. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9059/9/8/934>

LUU, L.; JOHNSTON, L. J.; DERRICOTT, H.; ARMSTRONG, S. D.; RANDLE, N.; HARTLEY, C. S.; DUCKWORTH, C. A.; CAMPBELL, B. J.; WASTLING, J. M.; COOMBES, J. L. An open-format enteroid culture system for interrogation of interactions between Toxoplasma gondii and the intestinal epithelium. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1-19, 2019.

MATTIX, B.; OLSEN, T. R.; GU, Y.; CASCO, M.; HERBST, A.; SIMIONESCU, D. T.; VISCONTI, R. P.; KORNEV, K. G.; ALEXIS, F. Biological magnetic cellular spheroids as building blocks for tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 623-629, 2014.

MAZUEL, F.; ESPINOSA, A.; LUCIANI, N.; REFFAY, M.; LE BORGNE, R.; MOTTE, L.; DESBOEUF, K.; MICHEL, A.; PELLEGRINO, T.; LALATONNE, Y.; WILHELM, C. Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels. **ACS Nano**, v. 10, n. 8, p. 7627-7638, 2016.

MELO, E. J. L.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W. The single mitochondrion of tachyzoites of Toxoplasma gondii. **Journal of Structural Biology**, v. 130, n. 1, p. 27-33, 2000.

NAYERI, T.; SARVI, S.; SHARIF, M.; DARYANI, A. Toxoplasma gondii: A possible etiologic agent for Alzheimer's disease. **Heliyon**, v. 7, n. 6, p. e07151, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07151>

NISHI, L.; SANFELICE, R. A. D. S.; BORTOLETI, B. T. D. S.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; SILVA, T. F.; EVANGELISTA, F. F.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; COSTA, I. N.; PAVANELLI, W. R.; CONCHON COSTA, I.; BAPTISTA, A. T. A.; BERGAMASCO, R.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Moringa oleifera extract promotes apoptosis-like death in Toxoplasma gondii tachyzoites in vitro. **Parasitology**, 2021.

PERNAS, L.; BEAN, C.; BOOTHROYD, J. C.; SCORRANO, L. Mitochondria Restrict Growth of the Intracellular Parasite Toxoplasma gondii by Limiting Its Uptake of Fatty Acids. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 4, p. 886-897.e4, 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.018>

POON, G. M. K.; GARIÉPY, J. Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells. *Biochemical Society Transactions*, v. 35, n. 4, p. 788-793, 2007.

PORTES, J. A.; MOTTA, C. S.; AZEREDO, N. F.; FERNANDES, C.; JR, A. H.; SOUZA, W. De. Veterinary Parasitology In vitro treatment of *Toxoplasma gondii* with copper (II) complexes induces apoptosis-like and cellular division alterations. *Veterinary Parasitology*, v. 245, n. April, p. 141-152, 2017.

RADKE, J. R.; STRIEPEN, B.; GUERINI, M. N.; JEROME, M. E.; ROOS, D. S.; WHITE, M. W. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 115, n. 2, p. 165-175, 2001.

RUEDA-GENSINI, L.; CIFUENTES, J.; CASTELLANOS, M. C.; PUENTES, P. R.; SERNA, J. A.; MUÑOZ-CAMARGO, C.; CRUZ, J. C. Tailoring iron oxide nanoparticles for efficient cellular internalization and endosomal escape. *Nanomaterials*, v. 10, n. 9, p. 1-56, 2020.

SARAF, P.; SHWAB, E. K.; DUBEY, J. P.; SU, C. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. *Experimental Parasitology*, v. 174, p. 25-30, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2017.01.009>

SATO, K.; NAGAYA, T.; NAKAMURA, Y.; HARADA, T.; CHOYKE, P. L.; KOBAYASHI, H. Near infrared photoimmunotherapy prevents lung cancer metastases in a murine model. *Oncotarget*, v. 6, n. 23, p. 19747-19758, 2015.

SCHINDELIN, J.; ARGANDA-CARRERAS, I.; FRISE, E.; KAYNIG, V.; LONGAIR, M.; PIETZSCH, T.; PREIBISCH, S.; RUEDEN, C.; SAALFELD, S.; SCHMID, B.; TINEVEZ, J. Y.; WHITE, D. J.; HARTENSTEIN, V.; ELICEIRI, K.; TOMANCAK, P.; CARDONA, A. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, v. 9, n. 7, p. 676-682, 2012.

SEEBER, F.; STEINFELDER, S. Recent advances in understanding apicomplexan parasites. *F1000Research*, v. 5, n. 0, p. 1369, 14 jun. 2016. Disponível em: <https://f1000research.com/articles/5-1369/v1>

SHAPIRO, K.; BAHIA-OLIVEIRA, L.; DIXON, B.; DUMÈTRE, A.; DE WIT, L. A.; VANWORMER, E.; VILLENA, I. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. *Food and Waterborne Parasitology*, v. 15, , 2019.

SIOW, W. X.; CHANG, Y. T.; BABIČ, M.; LU, Y. C.; HORÁK, D.; MA, Y. H. Interaction of poly-L-lysine coating and heparan sulfate proteoglycan on magnetic nanoparticle uptake by tumor cells. *International Journal of Nanomedicine*, v. 13, p. 1693-1706, 2018.

SOUZA, W. De; BELFORT JR., R. *Toxoplasmoses & Toxoplasma gondii*. [S.l: s.n.], 2014.

ŠTAMPAR, M.; BREZNIK, B.; FILIPIČ, M.; ŽEGURA, B. Characterization of In Vitro 3D Cell Model Developed from Human Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cell Line. *Cells*, v. 9, n. 12, , 2020.

TANABE, K. Visualization of the mitochondria of *Toxoplasma gondii*-infected mouse fibroblasts by the cationic permeant fluorescent dye rhodamine 123. *Experientia*, v. 41, n. 1, p. 101-102, jan. 1985. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3967730/>. Acesso em: 01 fev. 2022.

TCHORYK, A.; TARESCO, V.; ARGENT, R. H.; ASHFORD, M.; GELLERT, P. R.; STOLNIK, S.; GRABOWSKA, A.; GARNETT, M. C. Penetration and uptake of nanoparticles in 3D tumor spheroids. *Bioconjugate Chemistry*, v. 30, n. 5, p. 1371-1384, 2019.

TOMAVO, S.; SLOMIANNY, C.; MEISSNER, M.; CARRUTHERS, V. B. Protein Trafficking through the Endosomal System Prepares Intracellular Parasites for a Home Invasion. *PLoS Pathogens*, v. 9, n. 10, , 2013.

VELÁSQUEZ, Z. D.; CONEJEROS, I.; LARRAZABAL, C.; KERNER, K.; HERMOSILLA, C.; TAUBERT, A. *Toxoplasma gondii*-induced host cellular cell cycle dysregulation is linked to chromosome missegregation and cytokinesis failure in primary endothelial host cells. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2019.

VERONESI, F.; SANTORO, A.; MILARDI, G. L.; DIAFERIA, M.; MORGANTI, G.; RANUCCI, D.; GABRIELLI, S. Detection of *Toxoplasma gondii* in faeces of privately owned cats using two PCR assays targeting the B1 gene and the 529-bp repetitive element. *Parasitology Research*, v. 116, n. 3, p. 1063-1069, 2017.

WALLE, A. Van De; PLAN, A.; ABOU-HASSAN, A.; CURCIO, A.; HÉMADI, M. Biosynthesis of magnetic nanoparticles from nano- degradation products revealed in human stem cells. 2019.

WISSEL, K.; BRANDES, G.; PÜTZ, N.; ANGRISANI, G. L.; THIELEKE, J.; LENARZ, T.; DURISIN, M. Platinum corrosion products from electrode contacts of human cochlear implants induce cell death in cell culture models. *PLoS ONE*, v. 13, n. 5, p. 1-20, 2018.

ZENG, Y. B.; DONG, H.; HAN, H. Y.; JIANG, L. L.; ZHAO, Q. P.; ZHU, S. H.; MA, W. J.; CHENG, J.; HUANG, B. The ultrastructural effects of sulfachloropyrazine on *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Iranian Journal of Parasitology*, v. 8, n. 1, p. 73-77, 2013.

ZHANG, Y.; LAI, B. S.; JUHAS, M.; ZHANG, Y. *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis. *Microbiological Research*, v. 227, n. June, p. 126293, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.06.003>

ZHAO, X.; EWALD, S. E.; ZHAO, X.; EWALD, S. E. The molecular biology and immune control of chronic *Toxoplasma gondii* infection The molecular biology and immune control of chronic *Toxoplasma gondii* infection. v. 130, n. 7, p. 3370-3380, 2020.

ZHAO, X. Y.; EWALD, S. E. The molecular biology and immune control of chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Journal of Clinical Investigation*, v. 130, n. 7, p. 3370-3380, 2020.

ZHOU, Z.; ORTIZ LOPEZ, H. I. A.; PÉREZ, G. E.; BURGOS, L. M.; FARINA, J. M.; SALDARRIAGA, C.; LOPEZ-SANTI, R.; COTELLA, J. I.; PÉREZ, A. L. S.; BARANCHUK, A. Toxoplasmosis and the Heart. *Current Problems in Cardiology*, v. 46, n. 3, p. 100741, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2020.100741>

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.