AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DE BRADZOÍTOS DO PARASITA *TOXOPLASMA GONDII* EM CÉLULAS TUMORAIS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL LINHAGEM U87-MG

Lucas Leite Pereira, Cristina Pacheco Soares.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, pereiralucasleite@gmail.com, cpsoares@univap.br.

Resumo

A toxoplasmose é uma infecção de ampla distribuição mundial, podendo apresentar manifestações graves. A neurotoxoplasmose ocorre pela reativação de cistos presentes no sistema nervoso central e pode interagir com células tumorais, como as da linhagem U87-MG, derivada de glioblastoma. O presente estudo teve como objetivo avaliar a interação entre *Toxoplasma gondii* e células U87-MG utilizando um modelo tridimensional de cultura celular. Foram produzidos esferoides em moldes de agarose, posteriormente infectados com o parasita e analisados por microscopia confocal e eletrônica de varredura. Os resultados demonstraram a infecção e o encistamento do parasita, além de alterações na organização dos núcleos e filamentos de actina. Também foram observados possíveis rompimentos celulares associados à liberação de parasitas no meio extracelular. Os achados evidenciam a interação entre *Toxoplasma gondii* e as células tumorais, com alterações estruturais após a infecção. Conclui-se que o modelo tridimensional permitiu observar diferentes aspectos da infecção, mostrando-se adequado ao estudo da interação parasito-célula hospedeira.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Neurotoxoplasmose. Cultura 3D. U87-MG. Parasitologia

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas, Parasitologia

Introdução

A toxoplasmose é uma doença mundialmente negligenciada, que acomete um terço da população mundial, podendo causar quadros clínicos graves ou nem mesmo se manifestar (DIAN, et al; 2023). Sua contaminação ocorre geralmente através de 3 modos: alimentos contaminados ou mal cozidos; através do contato com fezes de felinos contaminados, (sendo o felino até o presente momento o único hospedeiro definitivo, e capaz de concluir o ciclo do parasita para ele se reproduzir de forma sexuada); e através da contaminação congênita, quando a mãe passa a contaminação para o filho através da placenta (ATTIAS, et al; 2020).

A Neurotoxoplasmose, é uma fase da doença, causada pelo estagio bradizoíto do parasita. Essa etapa da infecção ocorre por conta da reativação dos cistos, que se encontram nos tecidos do sistema nervoso, e são ativados devido a imunodeficiência do hospedeiro. (DE MELO, et al; 2020).

A linhagem U87-MG um glioma humano, células tumorais do sistema nervoso central (SNC) (Bastida, et al; 1984). Que com estudos recentes se mostra preocupante, decorrente de uma possível interação e aumento do tumor, quando o se encontra infectado com *Toxoplasma gondii* (Jung, et al; 2022).

O modelo 3D de cultura de células, acaba sendo uma alternativa mais fidedigna para estudos, pois, mimetiza o organismo *in vivo*. O modelo 3D apresenta um sistema mais fiel ao organismo, por conter várias camadas de células sobrepostas, trazendo resultados mais concretos em estudos de interações células hospedeiros, estudos de toxicidade, entre outros tipos de estudos (Ylostalo; 2020).

O presente trabalho teve como objetivo propor uma nova abordagem para o estudo da interação entre *Toxoplasma gondii* (TX) e culturas celulares, utilizando um modelo tridimensional constituído por múltiplas camadas celulares, capaz de reproduzir de forma mais representativa algumas das características do microambiente *in vivo* e, assim, contribuir para uma melhor compreensão da interação parasito–célula hospedeira.

Metodologia

Cultivo da linhagem U87-MG

As células da linhagem U87-MG foram cultivadas emde meio de cultura DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium), enriquecido com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% e finalizado a suplementação com 1% de Penicilina/Estreptomicina (Antibiótico e Antimicótico) a 37 °C com 5% de CO^2. O meio foi trocado a cada dois dias. A placa de cultura foi mantida em estufa de cultura celular

Moldes de Agarose

Os moldes do esferoide 3D foram confeccionados a partir de micropoços moldados em agarose autoclavada na concentração de 2% (m/v) diluída em PBS. Deste modo, 1,5ml dessa solução em temperatura morna para ficar em estado líquido, foi adicionada em placas de 12 poços e estampado com carimbos padronizados (Bio3DStamp), formando então micropoços não aderentes em tamanhos padronizados. Quando resfriada a agarose, ela se transforma do estado liquido para o estado sólido, podendo assim retirar o carimbo sem que ocorra a má formação dos micropoços. Realizado esse procedimento, a placa com os moldes foi preenchida com PBS e levada a luz UV por um período de 30 minutos.

Plaqueamento e infecção

Com os moldes devidamente prontos e esterilizados. Foi realizado o plaqueamento na concentração de 5×10^5. Após o período de formação dos esferoides, com a proporção aproximada de 5 a 7 parasitas por células, para que ocorresse a interação do *Toxoplasma gondii* nas células hospedeiras.

Microscopia Confocal

Após aproximadamente 7 dias de infecção a placa foi fixada, e os esferoides passaram por uma permeabilização com Triton X-100 0,1%, em PBS a 10 minutos, em seguida lavados. Para a marcação dos Núcleos, foi utilizado DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol). Para corar os filamentos de actina foi utilizado Rodamina Faloidina Devidamente preparadas, as amostras foram analisadas no microscópio confocal (Zeiss Axiovert 100M, Carl Zeiss GmbH, Jena, Alemanha).

Microscopia Eletrônica de Varredura:

A leitura no Microscópio Eletrônica de Varredura exige uma desidratação da amostra que se iniciou com a lavagem dos moldes utilizando PBS. Retirado todo excesso de PBS, foi adicionado etanol a 30% e deixado a 10 min em descanso, retirado o excesso, adicionado etanol a 50%, deixado em descanso por 10 minutos. Toda etapa seguinte da adição do etanol, a amostra descansou 10 minutos com uma nova concentração, até que se chegasse a concentração de 100%. Após 50%, as concentrações seguiram a sequencia de 70%, 80%, 90%, 95% e concluindo 100%.

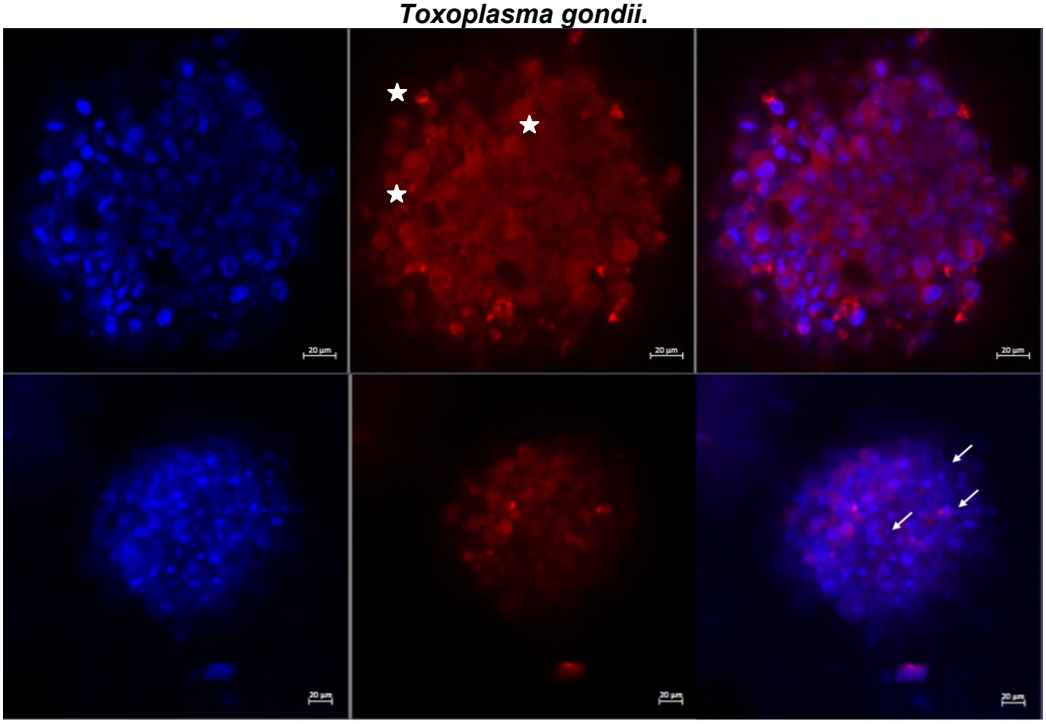
Resultados

A análise por microscopia confocal demonstrou a interação de *Toxoplasma gondii* com as células U87-MG, permitindo observar alterações morfológicas associadas à infecção. Em comparação ao grupo controle, as células infectadas apresentaram modificações na organização dos filamentos de actina e alterações na morfologia e delimitação nuclear. Além disso, foram observados parasitas associados às células, bem como estruturas compatíveis com parasitas no meio extracelular, sugerindo diferentes estágios da interação parasito–célula hospedeira (Figura 1).

Nas células U87-MG não infectadas, os núcleos apresentaram-se íntegros e bem delimitados pela marcação com DAPI, enquanto a rodamina-faloidina evidenciou uma rede de filamentos de actina organizada e distribuída pelo citoplasma. A sobreposição dos canais confirmou a preservação da arquitetura celular no grupo controle. Em contraste, nas células expostas a *T. gondii*, observou-se

menor definição da morfologia nuclear e alteração no padrão de distribuição dos filamentos de actina, caracterizada por perda da organização observada no controle. A presença de parasitas próximos às células e no espaço extracelular também foi evidenciada nas imagens (Figura 1, setas).

Figura 1 – Análise por microscopia confocal de células U87-MG controle e infectadas por *Toxoplasma gondii*.

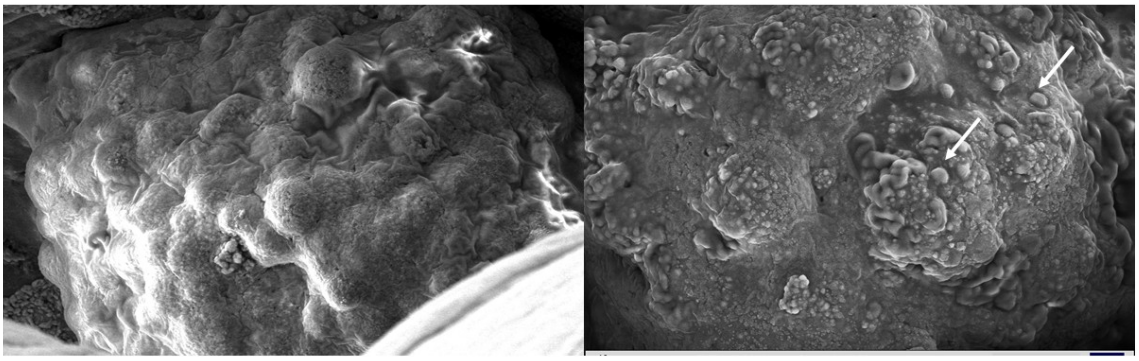


Fotomicrografias de células U87-MG não infectadas (A) e infectadas por *T. gondii* (B). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (cabeça de seta) e os filamentos de actina do citoesqueleto com rodamina-faloidina (estrela). As imagens *merge* correspondem à sobreposição dos canais de fluorescência. Nas células controle, observam-se núcleos bem delimitados e organização dos filamentos de actina. Nas células infectadas, são observadas alterações na morfologia nuclear e na organização do citoesqueleto, além da presença de parasitas associados às células e no meio extracelular (setas).

Fonte: O autor (2026).

A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciou alterações morfológicas na superfície das células U87-MG após a infecção por *Toxoplasma gondii* (Figura 2). Nas células infectadas, foram observadas regiões com acentuada irregularidade da superfície celular, bem como estruturas compatíveis com parasitas associadas à célula e/ou expostas na superfície (setas). Essas alterações não foram observadas com a mesma intensidade nas células controle, indicando modificações da arquitetura celular associadas à presença de *T. gondii*.

Figura 2 - Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de células U87-MG na ausência e presença de *Toxoplasma gondii*.



(A) Células U87-MG não infectadas, evidenciando a morfologia da superfície celular. (B) Células U87-MG infectadas por *T. gondii*, apresentando alterações na topografia da superfície e estruturas compatíveis com parasitas associadas à superfície celular (setas).Fonte: O autor (2026).

Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a interação de *Toxoplasma gondii* com células U87-MG cultivadas em modelo tridimensional, contribuindo para uma área ainda pouco explorada, especialmente no que se refere à relação entre o parasita e células derivadas de glioblastoma. As análises por microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura (MEV) forneceram evidências morfológicas complementares dessa interação, revelando alterações na organização celular associadas à presença do parasita. A microscopia confocal evidenciou alterações na morfologia nuclear e na organização dos filamentos de actina das células infectadas quando comparadas ao grupo controle. A reorganização do citoesqueleto é particularmente relevante durante a interação entre *T. gondii* e a célula hospedeira, uma vez que a invasão e o estabelecimento intracelular do parasita estão associados a modificações estruturais e funcionais da célula infectada. Além disso, a presença de estruturas compatíveis com parasitas no meio extracelular sugere a ocorrência de diferentes momentos da interação parasito–hospedeiro no modelo estudado.

Esses resultados encontram respaldo em estudos recentes que têm investigado a relação entre *T. gondii* e células tumorais. Jung et al. (2022) demonstraram que a infecção pelo parasita pode modular vias celulares relacionadas à sobrevivência, proliferação e resposta da célula hospedeira, sugerindo que a interação entre *T. gondii* e o microambiente tumoral envolve mecanismos mais complexos do que a simples invasão celular.

Nesse contexto, Jhandi et al. (2026) também destacam possíveis relações entre a infecção por *T. gondii* e alterações de processos celulares associados ao desenvolvimento e à progressão tumoral. Embora os resultados do presente trabalho não permitam estabelecer uma relação causal entre a infecção e o crescimento do glioblastoma, a capacidade do parasita de interagir com células U87-MG e as alterações morfológicas observadas reforçam a importância de investigar os efeitos dessa interação sobre o comportamento das células tumorais.

Complementarmente, a MEV revelou alterações expressivas na topografia das células infectadas e estruturas compatíveis com parasitas associadas à superfície celular. Esses achados reforçam os resultados obtidos por microscopia confocal e demonstram que a infecção está acompanhada de modificações morfológicas importantes nas células U87-MG. Entretanto, por representar uma análise morfológica pontual, a MEV não permite determinar isoladamente se as estruturas observadas correspondem a eventos de invasão ou saída do parasita. Essa distinção exigiria análises complementares, particularmente estudos temporais.

A interação entre *T. gondii* e células tumorais tem despertado interesse devido à capacidade do parasita de modificar diferentes processos celulares da célula hospedeira. Estudos recentes têm sugerido que a infecção pode interferir em vias relacionadas à proliferação, sobrevivência celular, resposta imunológica e regulação de genes associados à progressão tumoral (Jung et al., 2022; Jhandi et al., 2026). Nesse contexto, os achados do presente trabalho demonstram que células U87-MG são

capazes de sustentar a interação com *T. gondii*, embora os resultados obtidos não permitam estabelecer se essa interação favorece ou inibe diretamente a progressão tumoral.

Um dos aspectos relevantes deste trabalho é justamente a utilização do cultivo tridimensional. Diferentemente das culturas em monocamada, os modelos 3D permitem maior interação célula–célula e apresentam gradientes de nutrientes, oxigênio e metabólitos, além de diferenças na acessibilidade do parasita às diferentes regiões do esferoide. Dessa forma, a observação da interação de *T. gondii* com células U87-MG nesse sistema amplia as possibilidades de investigação da dinâmica da infecção em uma organização celular mais complexa.

Assim, os resultados demonstram a aplicabilidade do modelo 3D de células U87-MG para estudos da interação entre *T. gondii* e células de glioblastoma. Entretanto, estudos adicionais envolvendo marcadores específicos do parasita, análises temporais da infecção, quantificação da carga parasitária e avaliação de parâmetros relacionados à proliferação e morte celular serão importantes para compreender as consequências funcionais dessa interação.

Conclusão

O presente estudo demonstrou a interação de *Toxoplasma gondii* com células U87-MG cultivadas em modelo tridimensional. As análises por microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura evidenciaram a presença do parasita associada às células e alterações morfológicas relacionadas à infecção, incluindo modificações na organização do citoesqueleto, na morfologia nuclear e na topografia da superfície celular.

A utilização do modelo 3D mostrou-se particularmente interessante por proporcionar uma organização celular mais complexa do que aquela encontrada em culturas em monocamada, constituindo uma plataforma promissora para estudos da interação entre *T. gondii* e células de glioblastoma. Os resultados obtidos estabelecem, portanto, uma base experimental para estudos futuros destinados a investigar a dinâmica da infecção e seus possíveis efeitos sobre o comportamento das células tumorais.

Referências

ATTIAS, M. et al. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 588, 2020. DOI: 10.1186/s13071-020-04445-z.

BASTIDA, E. et al. Tissue factor in microvesicles shed from U87MG human glioblastoma cells induces coagulation, platelet aggregation, and thrombogenesis. **Blood**, v. 64, n. 1, p. 177–184, 1984.

DE MELO, L. M. C.; PAULISTA, M. T.; SÁNCHEZ, T. E. G. Neurotoxoplasmose em pacientes portadores de imunodeficiência humana e suas sequelas: uma revisão narrativa. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 81527–81538, 2020.

DIAN, S.; GANIEM, A. R.; EKAWARDHANI, S. Cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 117, n. 1, p. 14–23, 2023.

JHANDI, S. et al. *Toxoplasma gondii* and a cancer biology dichotomy: a systematic review of experimental studies of its antitumor and pro-tumor effects. **Pathogens**, v. 15, n. 4, p. 351, 2026.
JUNG, B. K. et al. Exosomal miRNA-21 from *Toxoplasma gondii*-infected microglial cells induces the growth of U87 glioma cells by inhibiting tumor suppressor genes. **Scientific Reports**, v. 12, p. 16450, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-20281-w.

TABAIE, E. Z. et al. *Toxoplasma gondii* infection of neurons alters the production and content of extracellular vesicles directing astrocyte phenotype and contributing to the loss of GLT-1 in the infected brain. **PLoS Pathogens**, v. 21, n. 6, p. e1012733, 2025. DOI: 10.1371/journal.ppat.1012733.

YLOSTALO, J. H. 3D stem cell culture. **Cells**, v. 9, n. 10, p. 2178, 2020. DOI: 10.3390/cells9102178.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação Valeparaibana de Ensino (FVE); FINEP acordo 01.13.0275.00.