

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Avaliação dos efeitos do tratamento com o extrato do fungo *Trichoderma stromaticum* em taquizoítos de *Toxoplasma gondii* *in vitro* e *in vivo*

Layane Alencar Costa Nascimento

Uberlândia
Outubro de 2014

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Avaliação dos efeitos do tratamento com o extrato do fungo *Trichoderma stromaticum* em taquizoítos de *Toxoplasma gondii in vitro* e *in vivo*

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial a obtenção do
título de Mestre.

Mestranda: Layane Alencar Costa Nascimento
Orientadora: Dr^a Neide Maria da Silva
Co-orientadora: Dr^a Bellisa de Freitas Barbosa

Uberlândia
Outubro de 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

N244a
2014 Nascimento, Layane Alencar Costa, 1983-
Avaliação dos efeitos do tratamento com o extrato do fungo
Trichoderma stromaticum em taquizoítos de *Toxoplasma gondii* *in vitro*
e *in vivo* / Layane Alencar Costa Nascimento. - 2014.
54 f. : il.

Orientadora: Neide Maria da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses.
3. *Trichoderma stromaticum* - Teses. 4. Fungos patogênicos - Teses.
I. Silva, Neide Maria da. II. Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
III. Título.

CDU: 612.017

Dedicatória

*Esse título dedico a você **Romulo**, que sempre me incentivou e nunca deixou que eu desistisse desse sonho. Sou muito feliz por ter você e o Mateus na minha vida. Espero que a nossa jornada seja sempre assim, com muito amor, confiança e companheirismo. Te amo profundamente!!!!*

Aos meus pais por todo apoio, amor e incentivo que deram a mim e aos meus irmãos. Muito obrigado por estarem sempre ao meu lado, amo vocês!

Aos meus irmãos que tanto amo, espero ser um exemplo pra vocês.

Aos meus segundos pais, Edna e Cícero, por toda força e ajuda, sem vocês eu não teria chegado aqui. Um muito obrigado especial a você Dona Edna, por inúmeras vezes ter ficado com o Mateus para eu poder estudar, esse título é um pouco seu também!

A minha Tia Lourdes e Ana Luisa, por serem essas pessoas especiais que tanto amo e admiro.

Aos meus queridos cunhados, Fábio, Tiago, Mara e Lilliane vocês são meus irmãos de coração, obrigada por torcerem por mim sempre...

Ao Paulo, Gigi, Thaisa e Thalita, por serem essa família linda que sempre me acolheu como uma filha, amo vocês!

Agradecimentos

A Deus, que sempre iluminou os meus passos ao caminho dos estudos.

À Prof^a Jane por ter me aceitado como aluna de IC e por ter despertado a vontade de aprender a fazer pesquisa, sem você eu não estaria aqui.

À Prof^a Neide por me orientar e me ensinar o trabalho científico com seriedade e responsabilidade e por confiar em mim;

A minha co-orientadora Dr^a Bellisa por ter me ensinado a mexer e gostar da cultura celular, não tenho palavras para agradecer a sua paciência e dedicação.

À minha família que sempre torce por mim e também faz parte desta conquista;

A Dona Cida por ter dos adotados como filhos em Ilhéus....

À tia Luzia, Jair, Loló, Vinicius e Sofia por terem nos acolhido como parte da família

A todos os colegas de laboratório pela convivência, ajuda e momentos de descontração, a vida acadêmica é bem melhor com vocês.

Às “meninas da Eloísa” **Angélica, Mariana, Priscila, Mayara, Andressa, Rafaela e Pâmela** que são pessoas iluminadas sempre com uma palavra amiga. Vocês são ótimas!

Aos técnicos da histologia **Fabício, Juscélia, Mariani, Rosiane, Ester** que me ajudaram muito desde o início;

Às técnicas do Programa de Imunoparasitologia por toda ajuda e paciência;

À **CAPES, CNPq e FAPEMIG** pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIACÕES

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CBEA – Centro de Biotério e Experimentação Animal

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

Células NK – células “natural killer”

Células Treg – células T reguladoras

CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais

CNS - Sistema Nervoso Central

DMEM - Dulbecco’s Modified Eagle Medium

DNA - ácido desoxirribonucleico

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ExtTs – extrato de *Trichoderma stromaticum*

HIV - vírus da imunodeficiência humano

IFN- γ – interferon-gama

IgA - imunoglobulina A

IgG – imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

IL-10 – interleucina 10

IL-12 – interleucina 12

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NO – óxido nítrico

OD - densidade óptica

PAMPs - padrões moleculares associados ao patógeno

PBS – salina tamponada com fosfato

PEF - fator de incremento de penetração

qPCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa

ROP - Roptrias

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SBF - soro fetal bovino

TGF- β – fator transformador de crescimento β

Th1 - células T auxiliaadoras 1

Th17 - células T auxiliaadoras 17

TLR - receptor tipo Toll

TNF – fator de necrose tumoral

WHO - Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Tabela 1. Tratamento de macrófagos J774 com diferentes condições experimentais divididas em 2 grupos que foram infectados ou não.....	26
Figura 1. Extrato do fungo <i>T. stromaticum</i> não promove citotoxicidade em macrófagos J774.....	33
Figura 2. Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774 tratados com extrato de <i>T. stromaticum</i> e infectados com <i>T. gondii</i>	34
Figura 3. Proliferação intracelular de <i>Toxoplasma gondii</i> em células J774.....	35
Figura 4. Quantificação de DNA de <i>T. gondii</i> por PCR (qPCR)	36
Figura 5. Perfil de citocinas mensurado no sobrenadante de cultura de macrófagos J774.....	37
Figura 6. Detecção de autofagia em macrófagos J774 por monodansilcadaverina.....	39
Figura 7. O pré-tratamento de taquizoítos de <i>T. gondii</i> com ExtTs protege os animais quanto a mortalidade.....	40

SUMÁRIO

RESUMO	10
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> : formas infectantes, interação parasito-hospedeiro e a toxoplasmose	12
1.2 Ciclo biológico	15
1.3 Resposta imune a <i>T. gondii</i>	16
1.4 O <i>Trichoderma stromaticum</i>	19
1.5 Medicamentos que inibem <i>T. gondii</i>	21
2. Justificativa	22
3. Objetivos	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. Materiais e métodos	23
4.1. Obtenção de esporos e preparo do extrato do fungo <i>T. stromaticum</i>	23
4.2 Animais	23
4.3 Cultivo celular	24
4.4 Manutenção <i>in vitro</i> da cepa RH-2F1 de <i>T. gondii</i>	24
4.5 Obtenção de IFN- γ no sobrenadante de células L1210	24
4.6 Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos J774 tratados com diferentes concentrações do extrato do fungo <i>T. stromaticum</i>	25
4.7 Dosagens das citocinas, IL-12, TGF- β , TNF e IL-10, em sobrenadantes de cultura de macrófagos J774 tratados ou não com diferentes concentrações do extrato e infectados com <i>T. gondii</i>	26
4.8 Quantificação da proliferação intracelular parasitária.....	27
4.8.1 Condições experimentais de tratamento para quantificar a proliferação parasitária <i>in vitro</i>	27
4.9 Extração e quantificação do DNA de <i>T. gondii</i> por PCR (qPCR).....	28
4.10 Efeito do ExtTs na indução de vesículas autofágicas em macrófagos J774.....	30
4.11 Análise do efeito do tratamento com diferentes concentrações do extrato de <i>T. stromaticum</i> na produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos J774 infectados ou não com <i>T. gondii</i>	30
4.11.1 Determinação dos níveis de nitrito no sobrenadante de macrófagos J774 tratados ou não com diferentes concentrações do extrato de <i>T. stromaticum</i> e infectados ou não com <i>T. gondii</i>	30

4.12 Avaliação <i>in vivo</i> do pré-tratamento de taquizoítos da cepa RH de <i>T. gondii</i> com ExtTs	31
4.13 Análise estatística.....	32
5. Resultados	33
5.1. Extrato do fungo <i>T. stromaticum</i> não promove citotoxicidade em macrófagos J774	33
5.2. O tratamento com diferentes concentrações do extrato de <i>T. stromaticum</i> diminui a produção de NO em macrófagos J774 infectados com <i>T. gondii</i>	33
5.3 O efeito do tratamento com diferentes concentrações do extrato de <i>T. stromaticum</i> sobre a proliferação intracelular de <i>Toxoplasma gondii</i> em macrófagos J774	34
5.4 Quantificação de DNA de <i>T. gondii</i> por PCR Tempo Real (qPCR)	35
5.4 Níveis das citocinas, IL-12, TGF- β , TNF e IL-10 nos sobrenadantes de cultura de macrófagos J774 tratados ou não com diferentes concentrações do extrato e infectados ou não com <i>T. gondii</i>	36
5.5 O tratamento com extrato de <i>T. stromaticum</i> diminui a formação de vesículas autofágicas em macrófagos J774 infectados com <i>T. gondii</i>	37
5.6 O tratamento de taquizoítos da cepa RH de <i>T. gondii</i> antes da inoculação de camundongos protege os animais contra a mortalidade	39
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*	46

RESUMO

Trichoderma é bem conhecido por inibir o crescimento e desenvolvimento de uma variedade de agentes patogénicos de plantas. Estudos anteriores demonstraram que o esporo do fungo *T. stromaticum* modula negativamente a resposta de fagócitos murino, diminuindo a produção de óxido nítrico (NO) e de espécies de oxigénio reactivas (ROS). *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório que induz uma forte resposta Th1 que ativa a produção de IFN- γ , que por sua vez ativa vários mecanismos da imunidade inata na infecção pelo *T. gondii*, como a produção de NO. A fim de investigar o efeito do extrato de *T. stromaticum* (ExtTs) no controle da proliferação cepa RH de *T. gondii* em células tratadas (macrófagos J774) ou diretamente na viabilidade do parasito, nós tratamos as células antes ou após a infecção; ou os parasitos com ExtTs e infectamos as células ou camundongos e observamos o parasitismo. Observou-se que os ExtTs não interferiram na produção de citocinas em células infectadas, apesar de diminuir a produção de NO e a detecção de vesículas autofágicas. No entanto, o tratamento de parasitos, com o ExtTs diminuiu o parasitismo nas células e camundongos. Assim, estes resultados mostraram que os ExtTs é um bom candidato para controlar a proliferação de *T. gondii*.

Palavras chave: ExtTs, J774 macrophage, *Toxoplasma gondii*, *Trichoderma stromaticum*

ABSTRACT

Trichoderma is well known by inhibit the growth and development of a variety of plant pathogens. Previous studies demonstrated that the fungal spore from *T. stromaticum* downmodulated the response of murine phagocytes by decreasing the production of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS). *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite that induces a strong Th1 response which activates the production of IFN- γ which in turn activates several innate immune mechanisms in *T. gondii* infection, such as NO production. In order to investigate the effect of *T. stromaticum* extract (ExtTs) in the control of RH strain of *T. gondii* in treated cells (J774 macrophages) or directly in the parasite viability, we treated cells before or after infection; or treated parasites with ExtTs and infected cells or mice and observed parasitism. It was observed that the ExtTs do not interfered in cytokine productin in infected cells, despite decreasing the NO production and autophagic vesicles detection. However, the treatment of parasites with ExtTs decreased the parasitism in the cells and mice. Thus, these results showed that the ExtTs is a good candidate to control *T. gondii* proliferation.

Key Words: ExtTs, J774 macrophage, *Toxoplasma gondii*, *Trichoderma stromaticum*

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*: formas infectantes, interação parasito-hospedeiro e a toxoplasmose

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório do filo Apicomplexa, subclasse coccídea (MONTROYA; LIESENFELD, 2004), que infecta uma grande variedade de hospedeiros e em certas circunstâncias, como em indivíduos imunocomprometidos (pacientes com câncer, portadores do vírus HIV e transplantados) e gestantes, pode causar doença de maior gravidade (DUBEY *et al.*, 2010). Descoberto simultaneamente em 1908 no Brasil por Splendore, em coelhos usados em experimentos laboratoriais, e por Nicolle e Manceaux, no *Ctenodactylus gundi*, um roedor africano usado na pesquisa da leishmaniose no Instituto Pasteur da Tunísia, foi inicialmente considerado por esses autores como pertencente ao gênero *Leishmania*. Em 1909, Nicolle e Manceaux caracterizaram esse parasito como uma nova espécie chamada *Toxoplasma gondii* por apresentar uma forma de arco (do grego: toxo, arco; plasma, vida) (KIM; WEISS, 2008).

Os membros do filo Apicomplexa são caracterizados pela presença do complexo apical, composto de organelas secretoras especializadas na adesão, invasão e multiplicação do parasito nas células hospedeiras como as micronemas, roptrias e grânulos densos (KIM; WEISS, 2008). As micronemas são organelas secretoras de moléculas adesivas, domínios tipo integrinas, fator de crescimento epitelial e lectina, sendo localizadas na região apical do parasito e abaixo do complexo da membrana interna (FOURMAUX *et al.*, 1996; MEISSNER *et al.*, 2002; SAOUROS *et al.*, 2005). Essas organelas atuam no reconhecimento e na adesão inicial do parasito aos receptores de superfícies da célula hospedeira [(CARRUTHERS, 2002); NEVES, 2005)]. As roptrias são organelas especializadas associadas com as micronemas, sendo seu conteúdo liberado durante a invasão do parasito, movimento de junção e formação do vacúolo parasitóforo (BRADLEY *et al.*, 2005; BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008). Estão localizadas na região anterior do núcleo do parasito e são constituídas por formações membranosas de extremidades dilatadas (LYCKE; CARLBERG; NORRBY, 1975; BLACK; BOOTHROYD, 2000). Já foram descritas vinte e nove proteínas de roptrias (ROP1 a ROP29) e elas estão associadas à internalização do parasito à célula hospedeira (BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008). Essa internalização é feita através da liberação de enzimas proteolíticas, como ROP-1 ou PEF (fator de incremento de penetração), que atuam na digestão de proteínas da membrana celular do hospedeiro (KIM; WEISS, 2004). Além disso, as roptrias liberam seu conteúdo proteico no citoplasma da célula hospedeira e atuam na formação do vacúolo parasitóforo ficando

associadas a ele, garantindo a natureza não fusogênica do vacúolo e atuando no recrutamento de mitocôndrias e retículo endoplasmático (SINAI; WEBSTER; JOINER, 1997; CARRUTHERS, 2002; SINAI, 2008). Os grânulos densos presentes no citoplasma do parasito, contêm glicoproteínas que quando liberados no vacúolo parasitóforo possibilita ao parasito evadir das respostas imunes da célula hospedeira, bem como a formação de túbulos especializados para aumentar a aquisição de nutrientes pelo parasito (COPPENS *et al.*, 2006; CARRUTHERS; SUZUKI, 2007).

T. gondii apresenta três diferentes estágios infectantes: os taquizoítos, os bradizoítos (nos cistos teciduais) e os oocistos. O termo “taquizoíto” (taqui = rápido) foi dado por Frenkel, em 1973, para descrever o estágio de rápida multiplicação e disseminação do parasita para todo tipo de célula (FRENKEL, 1973). O termo “taquizoíto” substitui o termo “trofozoíto” (trophicos = alimentação em grego) que era usado anteriormente. Medindo de 2-4µm de largura e 4-8µm de comprimento, os taquizoítos multiplicam-se rapidamente dentro do vacúolo parasitóforo e estão presentes em grande número na fase aguda da infecção. Depois de repetidas replicações, as células do hospedeiro são rompidas pelo aumento do número dos taquizoítos e estes são liberados e disseminados podendo infectar todo organismo atingindo tecidos como o sistema nervoso central, olhos, tecido muscular cardíaco e esquelético e placenta. As taxas de invasão e crescimento variam dependendo da cepa de *T. gondii* e o tipo de célula hospedeira. A presença dos taquizoítos inicia uma forte resposta inflamatória que leva a destruição tecidual, uma das manifestações clínicas típicas da toxoplasmose (DUBEY, 1998; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Os bradizoítos são originados a partir da conversão dos taquizoítos em estágios de divisão lenta (grego: brady = lento) e são encontrados dentro de cistos teciduais durante a infecção crônica. São morfologicamente idênticos aos taquizoítos, contudo expressam moléculas de estágio específico, apresentando função diferente. Cistos teciduais contêm centenas a milhares de bradizoítos e são formados dentro das células hospedeiras encontradas no tecido muscular cardíaco ou esquelético e cérebro. Seu tamanho é variado podendo medir entre 5 -70 µm. Os bradizoítos podem ser liberados dos cistos e se diferenciarem em taquizoítos causando o reaparecimento da infecção em pacientes imunocomprometidos (DUBEY, 1998; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Os oocistos são esféricos, medem entre 10-12µm e possuem uma parede dupla robusta que lhe confere proteção contra ações mecânicas e químicas. Sua parede é

formada por mais de 90% de proteínas, sendo várias proteínas ricas em tirosina e cisteína. O oocisto é a forma de resistência do parasito e são encontrados nas fezes de felinos. Durante a infecção aguda, milhares de oocistos são liberados nas fezes dos gatos por 7-21 dias, esses oocistos contêm esporozoítos que dão origem aos taquizoítos (DUBEY, 1998; MAI *et al.*, 2009; DUMETRE *et al.*, 2013).

Todas as três formas são infecciosas tanto para o hospedeiro definitivo quanto para o hospedeiro intermediário, e sua via de transmissão ocorre principalmente por ingestão oral de oocistos infecciosos do meio ambiente (solo, água ou alimentos), ingestão de cistos teciduais em carne crua ou mal cozida ou vísceras de hospedeiro intermediário e transmissão transplacentária de taquizoítos; já é conhecido que o leite materno de mãe infectada pode transmitir taquizoítos ao filho durante amamentação (CARRUTHERS; SUZUKI, 2007).

A toxoplasmose, doença causada por *T. gondii*, geralmente cursa de forma assintomática em indivíduos imunocompetentes. Mesmo nas infecções sintomáticas, poucas vezes a doença resulta em linfadenopatia cervical ou síndrome da mononucleose-like. No entanto, muitas manifestações clínicas têm sido atribuídas à infecção por *T. gondii* em indivíduos imunocomprometidos ou em crianças infectadas congenitamente, incluindo a linfadenopatia, ileíte, coriorretinite e encefalite (JACKSON; HUTCHISON, 1989; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; WEISS; DUBEY, 2009).

O curso da infecção se dá em duas fases, aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada pela presença predominante de taquizoítas nas células hospedeiras, que se multiplicam rapidamente no interior do vacúolo parasitóforo, destroem as células e invadem os tecidos adjacentes. Na fase crônica, bradizoítas no interior de cistos teciduais estão mais presentes, especialmente no cérebro, retina e tecido muscular; como uma ação do parasito contra a imunidade do hospedeiro (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). Pacientes imunocomprometidos sorologicamente positivos para *Toxoplasma* podem desenvolver encefalite toxoplásmica. Um estudo recente estimou que 30% dos portadores do HIV irão desenvolver a encefalite toxoplásmica se não fizerem o uso adequado do coquetel antiviral e de antiparasitários como forma de profilaxia (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

A estrutura populacional de *T. gondii* é tanto geneticamente quanto clonalmente diversificada, podendo ser subdividida em três linhagens encontradas na América do Norte e Europa denominadas de cepas tipo I, II e III: as cepas do tipo II são encontradas

predominantemente em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e causando toxoplasmose em humanos, já as cepas I e III são encontradas em doenças congênitas. As cepas do tipo I são geralmente letais para camundongos, porém as cepas dos tipos II e III são menos virulentas (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

Estimativas apontam que um terço da população mundial seja soropositiva, apresentando anticorpos específicos contra esse parasito, variando conforme a idade e distribuição geográfica (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Um estudo realizado por Robert-Gangneux e Darde relatou uma soroprevalência entre 30 e 50% na região sudeste e central da Europa e uma alta prevalência na América Latina e países tropicais do continente africano (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). No Brasil, 50-80% da população adulta apresenta anticorpos contra *T. gondii* (PENA *et al.*, 2008), sendo os jovens de 20-29 anos a faixa etária mais atingida (MAENZ *et al.*, 2014).

1.2 Ciclo biológico

O ciclo biológico de *T. gondii* foi somente elucidado após mais de 50 anos do primeiro relato do seu encontro. No final da década de 1960, a análise do material fecal de gatos possibilitou a descoberta de uma forma evolutiva do protozoário, capaz de induzir a infecção de outros mamíferos e aves através da sua ingestão. Seu ciclo coccidiano foi elucidado na década de 1970, quando foram encontrados estágios sexuais de *T. gondii* no intestino delgado de gatos (FRENKEL, 1973). Trata-se, portanto, de um parasito com ciclo de vida heteroxênico, tendo como hospedeiro definitivo (reprodução sexuada) gatos e outros felídeos e hospedeiros intermediários (reprodução assexuada) animais de sangue quente, incluindo o ser humano e aves (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

O desenvolvimento da fase sexuada ocorre quando os membros da família dos felídeos se contaminam com uma das três formas infectantes: taquizoítos, bradizoítos ou esporozoítos (DUBEY, 1998; MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011). Essa etapa do ciclo tem início quando os bradizoítos presentes nos cistos se transformam em gametócitos dentro das células epiteliais do intestino dos felídeos num processo conhecido como merogonia. A união dos gametócitos masculino e feminino dá origem ao zigoto que é envolto pela parede do oocisto (DUBEY, 1998; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). Após o rompimento das células do intestino do hospedeiro definitivo, os oocistos são liberados aos milhares nas fezes dos felídeos. No ambiente em condições

ideais de umidade e temperatura, num período de esporulação que dura entre 1 e 21 dias, o oocisto dá origem a dois esporocistos contendo cada esporozoítos no seu interior. O hospedeiro intermediário é infectado ao ingerir água ou alimentos contaminados com oocistos. A fase aguda da infecção do hospedeiro intermediário se inicia quando os esporozoítos se transformam em taquizoítos e invadem os enterócitos. Após o rompimento dos enterócitos pelos taquizoítos, ocorre a invasão das células nucleadas do hospedeiro, principalmente as células da musculatura esquelética, cardíaca e do sistema nervoso central (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

A principal forma de transmissão para o homem ocorre pelo consumo de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais, ou pela ingestão de alimentos contaminados com oocistos liberados nas fezes dos felinos. A transmissão vertical pode ocorrer durante a gestação onde a mãe, que não possui anticorpos protetores, se infecta e transmite via transplacentária o parasita para o feto, podendo levar a malformações e/ou ao aborto (KIM; WEISS, 2008). Ainda é citada a transmissão pelo contato com secreções como saliva, urina, espermatozoides e leite, ou ainda por órgãos transplantados e acidentes laboratoriais (NEVES et al., 1995; (DUBEY, 1998)).

1.3 Resposta imune a *T. gondii*

Há mais de sessenta anos, *T. gondii* tem sido um importante organismo modelo para tentar entender como o sistema imune murino promove resistência a patógenos intracelulares (TAIT; HUNTER, 2009). Devido à grande diversidade genética dos hospedeiros, a resposta imune contra a infecção por *T. gondii* se torna complexa, compartimentalizada e individual (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). Essa variação individual parece depender do *background* genético e estado imunológico do hospedeiro (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011). Embora os cistos sejam capazes de se formar em vários tecidos *in vitro*, em indivíduos infectados eles são mais prevalentes no tecido nervoso e muscular, incluindo o sistema nervoso central (SNC), os olhos e a musculatura esquelética e cardíaca. Podendo também ser encontrados no pulmão, fígado, rins e medula óssea (SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010).

A resposta imune contra infecção por *T. gondii* é caracterizada por uma forte resposta Th1 orquestrada por células TCD4⁺ e dominada pela produção de mediadores inflamatórios, sendo a interleucina (IL)-12 e interferon (IFN)- γ as citocinas pró-inflamatórias mais atuantes no controle da infecção (GAZZINELLI et al., 1994). Células

dendríticas e macrófagos ativados via *toll like receptors* (TLR) produzem IL-12 que ativa as células NK e linfócitos T a produzirem IFN- γ (GAZZINELLI *et al.*, 2014), IFN- γ ativa a expressão de mediadores pró-inflamatórios pelas células da imunidade inata, favorecendo o desenvolvimento dos linfócitos T, que são a base do controle da infecção por *T. gondii* no hospedeiro (GAZZINELLI; DENKERS, 2006).

Receptores do sistema imune inato tais como os receptores TLRs têm um importante papel no reconhecimento do parasito pelo hospedeiro. Os TLRs específicos envolvidos no reconhecimento de *T. gondii* incluem TLRs 2, 4, 7, 9, e 11. Camundongos deficientes em elementos essenciais comuns da via de sinalização TLR como IRAK4 ou MyD88 mostram uma prejudicada resistência a *T. gondii* devido a uma resposta deficiente de citocinas responsáveis pelo controle do parasita (BELA *et al.*, 2012). O TLR-11 recruta a molécula adaptadora MyD88, que está envolvida na sinalização intracelular dos TLRs, para o reconhecimento da molécula profilina (RAETZ *et al.*, 2013), essencial para motilidade e invasão celular de *T. gondii* (PLATTNER *et al.*, 2008). Na ausência do TLR11, a combinação de outros dois receptores endossomais TLR7 e TLR9, também recruta MyD88 ativando a resposta imune (ANDRADE *et al.*, 2013). Estudo realizado em camundongos deficientes da molécula adaptadora MyD88 mostraram maior susceptibilidade à infecção pela cepa ME-49 de *T. gondii* (SCANGA *et al.*, 2002). Portanto, TLRs são essenciais para uma eficiente resposta imune celular contra infecções por *T. gondii*.

Os fagócitos, componentes da imunidade inata, desempenham importantes funções relacionadas à defesa dos organismos contra diversos patógenos. A produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) são umas das estratégias utilizadas pelos fagócitos, durante a resposta imune inata, na tentativa de eliminação de *T. gondii*. As moléculas de NO, resultantes do metabolismo de L-arginina em L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), expressas em resposta a diversos estímulos incluindo IFN- γ , são produzidas por várias células da resposta imune inata, tais como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células NK, sendo importantes para a resistência inata do hospedeiro frente à infecção por *T. gondii*. (MILLER *et al.*, 2009).

NO é produzido constitutivamente em baixas concentrações pela NOS-1 e NOS-3 e tem um papel importante em processos fisiológicos agindo como um agente de relaxamento vascular, um neurotransmissor e um inibidor da agregação plaquetária (COLEMAN, 2001). Uma terceira isoenzima, NOS induzível (iNOS ou NOS-2), é

ativada em resposta a citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β para produzir altas concentrações de NO e esta é a forma comumente associada com a resposta à infecção parasitária. NO pode matar diretamente taquizoítos de *T. gondii*, inibindo enzimas mitocondriais e nucleares essenciais (BRUNET, 2001).

Os monócitos também produzem IL-1 em resposta a antígenos solúveis de *T. gondii* e esse fator aumenta os mecanismos efetores em macrófagos contra o parasito (GAZZINELLI *et al.*, 1995; HAMMOUDA *et al.*, 1995). Uma subsequente resposta imune celular do hospedeiro dependente da ação de IFN- γ que controla a infecção eliminando a maior parte dos taquizoítos de *T. gondii*. Entretanto, alguns parasitos resistem e se diferenciam em bradizoítos dentro de cistos, permanecendo em um estágio de dormência com multiplicação mais lenta nos tecidos principalmente nas células do SNC e musculatura esquelética, caracterizando assim a fase crônica da infecção. Os bradizoítos podem novamente se diferenciar em taquizoítos em indivíduos imunocomprometidos como, por exemplo, os que desenvolvem AIDS (SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010).

O papel crítico dos anticorpos na imunidade ao *T. gondii* é demonstrado em experimentos com camundongos μ MT, que são deficientes para células B. Esses camundongos apresentam produção normal de IFN- γ , mas sucumbem a infecção dentro de 3-4 semanas após o desafio, associado com altas cargas parasitárias no SNC (KANG; SUZUKI, 2001). O aumento de susceptibilidade é atribuído a falta de anticorpos, já que a transferência passiva de anticorpos confere proteção a estes mesmos camundongos (JOHNSON; SAYLES, 2002). A imunoglobulina M (IgM) é produzida logo após a infecção pelo *T. gondii*. As IgM são as melhores ativadoras do sistema do complemento e, devido a sua estrutura, são capazes de excelente aglutinação e têm um alto nível de citotoxicidade. Os principais antígenos alvo dessas imunoglobulinas são as proteínas de superfície do parasito (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004).

A imunoglobulina G (IgG) é uma classe de imunoglobulinas composta de várias subclasses, que aparecem em proporções desiguais durante a infecção. Em humanos estão presentes as subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Vários estudos da toxoplasmose humana têm demonstrado que IgG1 é a primeira a ser ativada e é dominante no plasma, enquanto que anticorpos IgG2 e IgG3 são observados em baixos níveis e os anticorpos IgG4 podem não ser detectados (HUSKINSON *et al.*, 1989). Anticorpos IgG1 e IgG3 são induzidos por IFN- γ e sua produção é aumentada por ação de IL-10 e TGF- β . A produção

de IgG2 é induzida por IL-2 e aumentada por IL-6, enquanto IgG4 é induzida por IL-4 e IL-13 (CORREA *et al.*, 2007). Os anticorpos IgG e suas subclasses promovem a citotoxicidade dependente de anticorpo ou opsonização, graças aos receptores de Fc presentes nos macrófagos e nas células polimorfonucleares, ou devido à citólise mediada por complemento ou por células NK (CANEDO-SOLARES *et al.*, 2008). A imunoglobulina A (IgA) é observada em duas formas: IgA de mucosa que é encontrada nas secreções mucosas e IgA do plasma. Na toxoplasmose, a IgA pode ser encontrada no trato digestivo e no plasma de animais e de humanos. Segundo Chardès & Bout (1993), os anticorpos IgA constituem mais de 80% de todos os anticorpos associados a mucosa e tecido (CHARDES *et al.*, 1993). Essa imunoglobulina persiste por seis a sete meses na toxoplasmose, entretanto varia bastante na quantidade e duração em adultos e recém-nascidos infectados pela via congênita. O sistema imune na mucosa possui extensa população de células linfóides que rapidamente entram em contato com o parasito durante sua penetração intestinal desencadeando a produção de citocinas e a produção de anticorpos que agem no local. Estudos indicam que IgA é um elemento importante da imunidade de mucosa contra a infecção oral por cistos de *T. gondii* e, portanto, esse isotipo de anticorpo pode ser importante para evitar a reinfecção (DENKERS; GAZZINELLI, 1998). Segundo Defrance *et al.* (1992), a resposta de IgA regularmente surge antes de IgG e sua produção é aumentada por estímulo de IL-10 e TGF- β (DEFRANCE *et al.*, 1992).

1.4 O *Trichoderma stromaticum*

Os fungos do gênero *Trichoderma* (ascomicetos) estão amplamente distribuídos por todo o mundo estando presentes em quase todos os tipos de solo e ambientes naturais, especialmente naqueles contendo matéria orgânica. O fato das espécies deste gênero desenvolverem-se em vários substratos torna esse grupo de grande interesse biotecnológico (ESPOSITO; DA SILVA, 1998).

Apesar dos fungos compartilharem muitas características básicas com as células de mamíferos, a principal distinção entre os dois grupos é a presença de parede celular rígida (LEVITZ, 2004). A parede dos fungos é composta principalmente de polissacarídeos (80%) e proteínas (3 – 20%), com lipídios, pigmentos e sais inorgânicos presente em poucas quantidades. Os componentes macromoleculares principais na parede

celular dos fungos (Ascomicetos, Basidiomicetos, Deuteromicetos) são β -glucan, quitina e manoproteínas (glicoproteínas). O β -glucan, a quitina e as microfibras de celulose são responsáveis pela firmeza e forma da parede celular (DIAZ; ZINKER; RUIZ-HERRERA, 1992). Essas estruturas microbianas são geralmente essenciais à sobrevivência do microrganismo e fazem parte do grupo de moléculas denominadas padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Tais estruturas são de extrema importância na interação patógeno-hospedeiro por serem reconhecidas por receptores de reconhecimento do padrão (PRR) presentes em células da imunidade inata, os quais desencadeiam a cascata de sinais citoplasmáticos que ativam as células para uma resposta imune efetora (PASARE; MEDZHITOV, 2004).

Espécies de *Trichoderma* são bem conhecidos por inibirem o crescimento e o desenvolvimento de uma variedade de patógenos de plantas (HERRERA-ESTRELLA & CHET, 1998; BENHAMOU; CHET, 1993), sendo utilizadas em um terço dos biocontroles fúngicos produzidos para o controle de fungos causadores de doenças na vegetação (STEYAERT *et al.*, 2003). Dentre essas, destaca-se o fungo *Trichoderma stromaticum* (SAMUELS *et al.*, 2000), isolado a partir de folhas secas de cacaueiros em Belém (PA), que tem sido utilizado sob a forma de biopesticida, o “Tricovab” (BASTOS, 1996), no controle biológico do fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*, o causador da doença vassoura-de-bruxa do cacaueiro (BASTOS, 1992). Resultados promissores em outros estudos demonstram que essa espécie, através do microparasitismo, pode reduzir em 99% a formação de basidiocarpos em vassouras em contato com o solo e em 56% em vassouras presas à planta (BASTOS, 1996). Este biopesticida tem sido produzido e distribuído pela Unidade de Biocontrole do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC-CEPLAC, Ilhéus-BA) desde 2000. Quando pulverizado em lavouras, o *T. stromaticum* germina e esporula podendo parasitar o fitopatógeno, competir com o mesmo por nutrientes e espaço, além de induzir resistência na planta hospedeira (BASTOS, 1992).

Em geral, os biopesticidas são considerados potencialmente seguros para a saúde humana. Entretanto, os microrganismos do ambiente sozinhos ou associados a moléculas constituintes de bioaerosóis podem desencadear doenças inflamatórias, a exemplo de esporos fúngicos de diversas espécies quando inalados (HAUSWIRTH; SUNDY, 2004; SAIKAI *et al.*, 2004; HAVAUX *et al.*, 2005).

Estudos recentes demonstraram que alguns fungos apresentam atividade antiparasitária como relatado por Campos e colaboradores onde encontraram que o

extrato do fungo *Cochliobolus* sp. eliminou 90% das formas amastigotas *Leishmania amazonenses* *in vitro* (CAMPOS *et al.*, 2008). A biomolécula fumagilina, isolada do fungo *Aspergillus*, interage com o *Plasmodium falciparum* inibindo o crescimento do parasito em experimentos *in vivo* e *in vitro* (CHEN *et al.*, 2009).

Alves-Filho e colaboradores (2011), em trabalho recente, investigaram a resposta imune de macrófagos e neutrófilos murinos aos esporos do fungo *Trichoderma stromaticum* (ALVES-FILHO *et al.*, 2011). Ensaio *in vitro* demonstraram uma regulação negativa na produção de NO pelos macrófagos tratados com os esporos do fungo, sendo essa redução reflexo dos baixos níveis da enzima iNOS. Experimentos *in vivo* mostraram que o esporo também inibiu a produção da citocina reguladora IL-10 e da citocina pró-inflamatória IFN- γ por células do baço de camundongos. Juntos, esses resultados sugerem uma ação imunossupressora dos esporos do *T. stromaticum*, por suprimir mecanismos microbicidas e diminuir a resposta imune sistêmica reguladora e pró-inflamatória em camundongos (ALVES-FILHO *et al.*, 2011).

1.5 Medicamentos que inibem *T. gondii*

A sulfadiazina e pirimetamina assim como atovaquona, são as drogas consideradas de primeira escolha para o tratamento da maioria das apresentações clínicas da toxoplasmose (PETERSEN; SCHMIDT, 2003). Embora esta terapia seja frequentemente bem sucedida, está associada com muitos efeitos colaterais incluindo a supressão da medula óssea, o que requer a administração concomitante de ácido folínico (MARTINS-DUARTE *et al.*, 2006).

Além do fato de que o tratamento não é frequentemente bem tolerado, é necessária a substituição de sulfadiazina por outras drogas, tais como a clindamicina (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Estudo anterior demonstrou o uso da infusão de *A. annua*, como um tratamento eficaz no controle da infecção sistêmica pelo *T. gondii* em camundongos C57BL/6, apresentando uma baixa toxicidade e inibição direta do crescimento do parasito (DE OLIVEIRA *et al.*, 2009). Assim, a descoberta de drogas menos tóxicas que são ativas contra todas as fases do parasita é crucial para tratar a infecção por *T. gondii*.

2. Justificativa

Sabe-se que no Brasil, 50-80% da população adulta apresenta anticorpos contra *T. gondii* e que os fagócitos apresentam um papel fundamental na resposta imune inata contra essa infecção através da produção de ROS e NO.

Recentemente foi demonstrado que o esporo do fungo *T. stromaticum*, usado principalmente como biopesticida na lavoura cacaueira, modula negativamente a resposta de fagócitos, diminuindo a produção de NO e ROS e reduzindo citocinas reguladoras e inflamatórias, podendo afetar a resposta imune dos manipuladores desse biopesticida em detrimento a várias infecções, inclusive por *T. gondii*. Por outro lado, é eminente a descoberta de novas drogas/agentes que possam controlar *T. gondii* e que sejam menos tóxicos. Portanto, este trabalho se justifica pela necessidade do entendimento entre a relação que possa existir entre a interferência na resposta imune por fungos da espécie *T. stromaticum* e consequentemente na resposta imune induzida pela infecção por *T. gondii*, assim como no desenvolvimento de novas estratégias que possam controlar o parasito.

Assim, sabendo-se que os fungos podem interagir de diferentes maneiras com os diferentes tipos de parasitas e que 50-80% da população adulta apresenta anticorpos contra *T. gondii*, é necessário a avaliação para maior entendimento entre a relação que possa existir entre o extrato do fungo *T. stromaticum* e a infecção pelo *T. gondii*.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Verificar a influência do extrato de *T. stromaticum* na resposta imune contra *T. gondii* em macrófagos murinos (linhagem J774), bem como a sua interação direta com o parasita.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Produção do extrato de *T. stromaticum* para utilização nos cultivos *in vitro*.
- 2- Verificar a viabilidade celular de macrófagos J774 tratados com diferentes concentrações do extrato de *T. stromaticum*.
- 3- Verificar se o tratamento com diferentes concentrações do extrato está relacionado com a produção de óxido nítrico durante a infecção por *T. gondii*.

4- Verificar a proliferação de *T. gondii* em macrófagos J774 tratadas ou não com diferentes concentrações do extrato do fungo e infectados com *T. gondii*.

5- Verificar o perfil de citocinas IL-12, TNF, IL-10 e TGF- β de macrófagos J774 tratados ou não com diferentes concentrações do extrato e infectados com *T. gondii*.

6- Verificar a indução de autofagia em macrófagos J774 tratados ou não com diferentes concentrações do extrato e infectados ou não com *T. gondii*.

7- Avaliar o escore de morbidade, mortalidade e alteração de massa corpórea de camundongos infectados com a cepa RH de *T. gondii* tratados ou não com o extrato de *T. stromaticum*.

4. Materiais e métodos

4.1. Obtenção de esporos e preparo do extrato do fungo *T. stromaticum*

O isolado do fungo *T. stromaticum* ALF 64, usado na preparação do Tricovab® (Cepec-Ceplac), foi gentilmente cedido pela Dra. Jane Lima dos Santos (Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, Ilhéus- BA). O fungo foi cultivado em placas de Petri em meio Batata Dextrose Agar (BDA) em temperatura ambiente durante 7 a 15 dias.

Entre 7 e 15 dias de cultivo, os esporos de *T. stromaticum* ALF 64 foram coletados por lavagem da superfície micelial com etanol 95% (5mL/placa). A solução etanólica foi homogeneizada em agitador por 24 horas. Após homogeneização, a solução foi centrifugada a 2200 x g por 20 minutos a 18 °C (FUKUZUWA *et al.*, 2008). A solução etanólica obtida foi denominada extrato bruto de *T. stromaticum* (ExtTs). Essa solução etanólica ExtTs foi liofilizada para que todo o líquido fosse retirado (processo de sublimação). O ExtTs após liofilização (pó) foi ressuscitado em PBS estéril e em seguida foi realizada a dosagem de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e armazenado a – 20°C.

4.2 Animais

Fêmeas de camundongos C57BL/6 e Swiss com oito semanas de idade foram obtidos e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia em condições padronizadas de criação, com ciclos de 12/12 horas de luz sob condições livres de patógenos específicos (SPF) com livre acesso a água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados com aprovação

do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA)/UFU sob o número de protocolo 110/11.

4.3 Cultivo celular

A linhagem celular murina do tipo macrófago (J774) foi adquirida do *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA) e mantida em cultura no Laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Os macrófagos foram cultivados em frascos de cultura de 25cm² contendo meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) (Cultilab), 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO₂.

O repique das células foi realizado a cada três dias e procedeu-se, brevemente, da seguinte maneira: novo meio de cultura foi adicionado à garrafa de cultivo e com o uso de “cell scrapers” as células foram retiradas e transferidas para tubos de 15 ml e centrifugadas à temperatura ambiente, por 5 minutos a 1500 rpm. O “pellet” foi então ressuspensão em 1 ml de meio de cultura contendo soro e distribuído em duas novas garrafas de cultivo celular. O excedente foi congelado em meio de congelamento (90% de meio de cultura a 10% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido – DMSO).

4.4 Manutenção *in vitro* da cepa RH-2F1 de *T. gondii*

Parasitas da cepa RH-2F1 de *T. gondii* que expressam constitutivamente o gene da β -galactosidase, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Vern Carruther Medicine School of Michigan University (USA) e mantidos na linhagem de células epiteliais uterinas humanas (HeLa), obtidas do ATCC, cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SBF) (Cultilab), 100 U/mL penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Sigma). Os parasitos foram mantidos por passagem seriada em intervalos regulares de 48 horas e incubados em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂.

4.5 Obtenção de IFN- γ no sobrenadante de células L1210

A linhagem celular L1210 de células tumorais de leucemia linfoblástica de murinos, adquirida do ATCC foi mantida em meio RPMI 1640. A cada três dias, o repique

de células foi realizado e o sobrenadante coletado e acondicionado em freezer -80°C até o momento do uso.

Para a determinação da concentração de IFN- γ contida no sobrenadante, foi realizado um Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA). As concentrações da citocina nas amostras de sobrenadante foram calculadas a partir de uma curva padrão da citocina murina recombinante. A concentração de IFN- γ encontrada no sobrenadante das células L1210 foi de 13ng/ml.

4.6 Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos J774 tratados com diferentes concentrações do extrato do fungo *T. stromaticum*

A viabilidade celular dos macrófagos J774 foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (Sigma), que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem metabolicamente o sal de MTT, por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica, em cristais de formazan de cor azul-púrpura que se acumula no citoplasma celular (MOSMANN *et al.*, 1983).

As células J774 foram retiradas dos frascos de cultura pela ação do gelo, centrifugadas e ressuspensas em 1 ml de meio DMEN sem soro e contadas em câmara de Neubauer. Após o ajuste para uma concentração de 3×10^4 células a cada 200 μ L de meio, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços e mantidas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, os meios foram aspirados e descartados, as células foram tratadas com diferentes concentrações do ExtTs (1 μ g/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62,5 ng/ml, 31,25ng/ml e 15,6 ng/ml) e incubadas novamente por 24h em estufa a 37° C, 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com meio e adicionadas 10 μ L de azul de tiazolil (solução de MTT) na concentração de 5 mg/mL em 90 μ L de meio RPMI completo e incubadas por mais 4 horas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as partículas insolúveis de coloração roxa produzidas por células viáveis que metabolizaram o MTT foram então solubilizadas com 100 μ L/poço de solução 10% de duodecil sulfato de sódio (SDS) e 50% N, N-dimetil formamida. Após 30 minutos de incubação, a densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor de placa (Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A porcentagem de células viáveis foi calculada em todas as condições experimentais em relação ao

controle (células não tratadas), que correspondeu a 100% de viabilidade (BARBOSA *et al.*, 2012).

4.7 Dosagens das citocinas, IL-12, TGF- β , TNF e IL-10, em sobrenadantes de cultura de macrófagos J774 tratados ou não com diferentes concentrações do extrato e infectados com *T. gondii*.

As células J774 foram retiradas dos frascos de cultura pela ação do gelo, centrifugadas e ressuspensas em 1 ml de meio DMEN com SFB e contadas em câmara de Neubauer. Após o ajuste para uma concentração de 3×10^4 células/200 μ L de meio, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços e mantidas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, os meios foram aspirados e descartados, as células foram tratadas em diferentes condições experimentais de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Tratamento de macrófagos J774 com diferentes condições experimentais divididas em 2 grupos que foram infectados ou não.

Tratamento	Infecção	
Extrato	-	+
1 μg/ml	-	+
500 ng/ml	-	+
250 ng/ml	-	+
125 ng/ml	-	+
62,5 ng/ml	-	+
IFN-γ (Controle +)	-	+
DMEN (Controle -)	-	+

Todas as condições foram realizadas em sextuplicada e repetidas em 3 ensaios diferentes. O grupo infectado recebeu uma proporção de cinco parasitos por célula (5:1) da cepa RH-2F1 e permaneceu por mais 24 horas nas mesmas condições de cultura.

Após 24 horas de infecção o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -80°C, para posterior análise do perfil de citocinas por ELISA sanduíche de acordo com as instruções do fabricante como se segue: IL-12p70 e fator transformador de crescimento (TGF)- β (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) e TNF e IL-10 Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). As concentrações das citocinas nas amostras dos sobrenadantes celulares foram calculadas a partir de uma curva padrão de citocinas murinas recombinantes. O limite de detecção para cada ensaio foi de 39 pg/ml (IL-12p70),

31,3 pg/ml (IL-10), 15,6 pg/ml (TNF) e 15,6 pg/ml (TGF- β). Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio ficaram abaixo de 20% e 10%, respectivamente.

4.8 Quantificação da proliferação intracelular parasitária

A proliferação intracelular de *T. gondii* foi determinada por ensaio colorimétrico de β -galactosidase descrito previamente por Teo *et al.* 2007 e Barbosa *et al.* 2014. Em todas as condições experimentais de tratamento e infecção, foi preparada em paralelo uma curva de referência com diluições duplas seriadas da taquizoítas de *T. gondii* 2F1 (RH) variando de 1×10^6 a $15,625 \times 10^3$ parasitos em 100 μ l de meio com 2% SFB. Brevemente, após 24 horas de infecção a 37° C, 5% de CO₂, o sobrenadante foi descartado e logo em seguida, as células foram lisadas com 100 μ l/poço de tampão de lise gelado (HEPES a 100mM pH 8, MgSO₄ a 1 mM, Triton X-100 a 0,1 %, Ditioneitol a 5Mm) por 15 minutos. Em seguida, foi adicionada 160 μ l/poço de tampão de ensaio (tampão fosfato a 100 mM pH 7,3, β – mercaptoetanol a 102 mM e MgCl₂ a 9 mM) e 40 μ l de CPRG (β - D – galactopiranosideo vermelha de clorofenol; Roche, Indianopolis, IN, EUA) a 3 mM foram adicionados. Após 30 minutos a temperatura ambiente no escuro, a atividade enzimática da β - galactosidase foi determinada a 570 nm em leitor de placa (Versa Max ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Os resultados foram expressos com o número de taquizoítas calculados em relação à curva de referência com taquizoítas 2F1.

4.8.1 Condições experimentais de tratamento para quantificar a proliferação parasitária *in vitro*

Após o cultivo de células J774 em placas de 96 poços (3×10^4 células/poço/200 μ L) em meio completo por 24 h a 37°C e 5% CO₂, foram realizadas em três condições experimentais

4.8.1.1 Tratamento dos macrófagos J774 antes da infecção por *T. gondii*

Os macrófagos J774 foram tratados com diferentes concentrações do ExtTs (1 μ g/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml e 62,5 ng/ml) ou somente com meio na condição controle, após 24 horas de tratamento, as células foram lavadas com meio puro e infectadas com taquizoítas da cepa RH-2F1 de *T. gondii*, com taxa de infecção de 5:1 (parasito: célula) e incubadas por mais 24 h a 37°C e 5% CO₂. A proliferação intracelular

de *T. gondii*, foi determinada por ensaio colorimétrico com β -galactosidase (Barbosa et al. 2014; Teo et al. 2007). Três experimentos independentes foram realizados em sextuplicada para cada condição experimental.

4.8.1.2 Tratamento dos macrófagos J774 após infecção parasitária

Após 24 horas de cultivo, os macrófagos J774 foram lavados com meio e infectadas com taquizoítos da cepa RH-2F1 de *T. gondii*, com taxa de infecção de 5:1 (parasito: célula). Após 3 horas de infecção a 37°C e 5% de CO₂, as células foram novamente lavadas para remover os parasitos não aderentes e, em seguida, tratadas com diferentes concentrações do ExtTs (1 μ g/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml e 62,5 ng/ml) ou somente com meio na condição controle. Após 24 h de incubação a 37°C e 5% de CO₂, a proliferação intracelular de *T. gondii* foi determinada por ensaio colorimétrico com β -galactosidase. Três experimentos independentes foram realizados em sextuplicada para cada condição experimental.

4.8.1.3 Pré-tratamento dos parasitos antes da infecção de macrófagos J774

Taquizoítos da cepa RH-2F1 de *T. gondii* na proporção de 5:1 (parasito: célula), foram pré-tratados por 1 h a 37°C e 5% CO₂ com diferentes concentrações de ExtTs (1 μ g/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml e 62,5 ng/ml) ou com meio na condição controle. Após o tratamento, os taquizoítos foram centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm e lavados com meio puro, esses foram incubados aos macrófagos J774 por mais 24 horas. A quantificação da proliferação intracelular de *T. gondii* foi determinada por ensaio colorimétrico com β -galactosidase. Três experimentos independentes foram realizados em sextuplicada para cada condição experimental.

4.9 Extração e quantificação do DNA de *T. gondii* por PCR (qPCR)

Inicialmente para quantificar o DNA de *Toxoplasma gondii*, células J774 foram cultivadas em placas de 24 poços (4x10⁵ células/300 μ l/poço) a 37°C por 24h. Posteriormente, as células foram infectadas com taquizoítos da cepa RH-2F1 de *T. gondii* previamente tratados com diferentes concentrações do ExtTs (1 μ g/ml, 250 ng/ml or 62,5 ng/ml) ou com meio na condição controle, na proporção 5:1 parasitos por célula por 24h a 37°C e 5% de CO₂.

O isolamento do DNA total de células J774 infectadas foi obtido seguindo o método fenol-clorofórmio descrito anteriormente [SAMBROOK 2001; (MAHITTIKORN; WICKERT; SUKTHANA, 2005)], com algumas modificações. Brevemente, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com PBS estéril e a lise celular foi feita com tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0 and 1% SDS). Posteriormente, proteinase K foi adicionada a uma concentração final de 0,5mg/ml e o lisado foi incubado a 56°C por uma hora com agitação a cada 15 minutos. A solução Fenol-clorofórmio foi adicionada e os tubos incubados a -20°C por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 12.000 rpm e a fase aquosa foi transferida para novos microtubos e um segundo passo de extração fenol-clorofórmio foi realizado. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm e a fase aquosa foi transferida para novos tubos. Em seguida, 800 µl de álcool absoluto mais 40 µl de acetato de sódio 3M estéril (pH 5.2) foram adicionados em cada tubo e incubados por 1 hr a -20° C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 12.000 rpm. O DNA precipitado foi lavado com 800 µl de álcool 70% e novamente centrifugado por 5 minutos a 12.000 rpm. O álcool foi removido e o DNA foi dissolvido em 100 µl de tampão TE pH 7.6 (10 mM Tris, 1 mM EDTA). A solução foi estocada a -20° C até o momento do uso.

O parasitismo de macrófagos J774 infectados com a cepa RH-2F1 de *T. gondii* foi realizado pelo ensaio de PCR tempo real. As reações de PCR foram realizadas em duplicada em 3 ensaios diferentes com SYBR Green (Applied Biosystem). As condições do PCR foram configuradas para 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. O fragmento 529 pb (forward: 5'-gctcctccagccgtcttg-3', reverse: 5'-tcctcaccctgccttcac-3') foi usado para determinar e quantificar a presença de *T. gondii* e β -actina (forward: 5'-cactattggcaacgagcgg-3', reverse: 5'-gccacaggattccataccca-3') foi utilizada para normalizar a quantidade de DNA genômico total. As alterações na razão de DNA gene alvo/ β -actina foi determinada pela fórmula: $2^{\Delta\Delta Ct}$. A regressão linear foi usada para estabelecer a quantidade absoluta de parasito em cada condição pela fórmula: $P(\log_2)=36.91-0.9158*CT$.

4.10 Efeito do ExtTs na indução de vesículas autofágicas em macrófagos J774

Macrófagos J774 foram cultivados em lâminas Millicell-Millipore (4×10^4 células/180 μ L/poço) por 24h a 37°C e 5% CO₂. As células foram tratadas com 250ng/ml e 500ng/ml do ExtTs e incubadas por 24h. O inibidor de autofagia Wortmanin foi utilizado (0,1mM) como controle do ensaio. Posteriormente, as células foram lavadas com meio puro e infectadas com taquizoítos de *T. gondii* (5:1) por mais 24h. Após a infecção, as células foram incubadas com monodansilcadaverina (MDC) na concentração de 0,05mM por 60 minutos a 37°C, lavadas com PBS e observadas em microscópio confocal com laser de diodo azul (405nm) e um filtro BP de 420-480nm. As imagens foram adquiridas e analisadas em objetiva 20 \times / 1.2W C-apocromática em Microscópio Confocal com varredura a laser LSM 510 Carl Zeiss.

4.11 Análise do efeito do tratamento com diferentes concentrações do extrato de *T. stromaticum* na produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos J774 infectados ou não com *T. gondii*

As células J774 foram retiradas dos frascos de cultura pela ação do gelo, centrifugadas e ressuspensas em 1 ml de meio DMEN sem soro e contadas em câmara de Neubauer. Após o ajuste para uma concentração de 3×10^4 células a cada 200 μ L de meio, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços e mantidas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, os meios foram aspirados e descartados, as células foram tratadas com diferentes concentrações ExtTs (1 μ g/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml e 62,5 ng/ml) ou com IFN- γ , na concentração de 1.5 ng/mL (controle positivo) e incubadas novamente por 24h em estufa a 37° C, 5% de CO₂. Para a infecção das células, a cepa RH de *T. gondii* foi utilizada na proporção de 5 parasitos por célula. Após 24 horas de infecção o sobrenadante das células foi coletado e guardado a -80°C. Dois experimentos independentes foram realizados em sextuplicada.

4.11.1 Determinação dos níveis de nitrito no sobrenadante de macrófagos J774 tratados ou não com diferentes concentrações do extrato de *T. stromaticum* e infectados ou não com *T. gondii*

A concentração de nitrito em sobrenadantes de células J774 foi mensurada pelo método de Griess (GREEN *et al.*, 1982) como um indicativo da produção de NO.

Brevemente, 50 µl de sobrenadante de cultura foram homogeneizados com reagente de Griess [sulfanilamina 1% e diidrocloreto de naftaleno (NEED) 0,1% na proporção 1:1] por 10 minutos e a absorbância foi determinada em 540 nm. Foi utilizado meio de cultura como branco e os níveis de nitrito em cada amostra foram calculados a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂).

4.12 Avaliação *in vivo* do pré-tratamento de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* com ExtTs

Com a finalidade de avaliar o efeito do pré-tratamento de taquizoítos da cepa RH-2F1 de *T. gondii* com ExtTs sobre a sobrevivência dos animais, dois ensaios foram realizados usando doses diferentes de ExtTs e tempos distintos de tratamento.

Em um primeiro experimento, 1×10^3 parasitos/animal foram tratados com 1 µg/ml de ExtTs ou com meio na condição controle por 1 hora a 37°C. Após o tratamento a solução de parasitos foi centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm e o pellet ressuspenso em PBS estéril. Dois grupos com 10 camundongos Swiss em cada foram infectados com parasitos tratados com ExtTs e o outro com parasitos não tratados mantidos nas mesmas condições. Os animais de cada grupo foram infectados por via intraperitoneal (i.p) com os parasitos dos seus respectivos tratamentos e observados diariamente quanto à sobrevivência e pesados para avaliação da variação do peso corporal.

Em um segundo experimento, 3×10^4 parasitos/animal foram previamente tratados com 2 µg/ml de ExtTs ou com meio na condição controle, por 3 horas a 37°C. Após o tratamento a solução de parasitos foi centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm e o pellet ressuspenso em PBS estéril. Dois grupos com 5 camundongos C57BL/6 em cada, foram infectados com parasitos tratados com ExtTs e o outro com parasitos não tratados mantidos nas mesmas condições. Os animais de cada grupo foram infectados por via intraperitoneal (i.p) com os parasitos dos seus respectivos tratamentos e observados diariamente quanto a sobrevivência.

Por último, foi feita a extração de bradizoítos de ME-49 com uma solução de digestão. Para isso, macerou-se em uma capela de fluxo laminar, o cérebro de um camundongo Swiss previamente infectado por mais de 30 dias, com 5ml da solução HIBS (Solução salina balanceada de Hank com 20% de soro bovino inativado) acrescido de 20% de dextran. O homogenato foi centrifugado por 10 min a 4,000 x g, o sobrenadante descartado e adicionado 1ml de HIBS ao sedimento. Para digerir os cistos, foi adicionado

1ml de solução de digestão [1g de NaCl, 1,4 ml de HCl e 1 mg de pepsina do estomago suíno, Sigma (atividade 1:60.000), em 100 ml de água] e incubado por 1 minuto a 37°C (banho Maria) sob agitação. A neutralização dessa suspensão ácida (pH 1,5-2,0) foi feita com aproximadamente metade do volume de Na₂CO₃. A solução resultante foi injetada no camundongo.

Todos os animais sobreviventes foram sacrificados 30 dias pós-infecção (dpi) e seus tecidos (soro, cérebro, fígado e pulmão) foram coletados para posterior análise imunohistoquímica, reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de *T. gondii* e sorologia de imunoglobulinas.

4.13 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram determinadas por one-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPadSoftware, Inc., San Diego, EUA). O método de Kaplan-Meier foi usado para comparar as taxas de sobrevivência entre os grupos estudados (FLETCHER et al., 1996) e as curvas de sobrevivência foram comparadas usando o teste χ^2 . Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. Resultados

5.1. Extrato do fungo *T. stromaticum* não promove citotoxicidade em macrófagos J774

Para verificar o efeito de diferentes concentrações do extrato do fungo *T. stromaticum* na viabilidade celular dos macrófagos J774 tratados, o ensaio MTT foi realizado. Ao analisar a viabilidade celular, após tratamento com as diferentes concentrações do ExtTs, foi verificada que nenhuma das concentrações apresentou efeito citotóxico para as células (Figura 1).

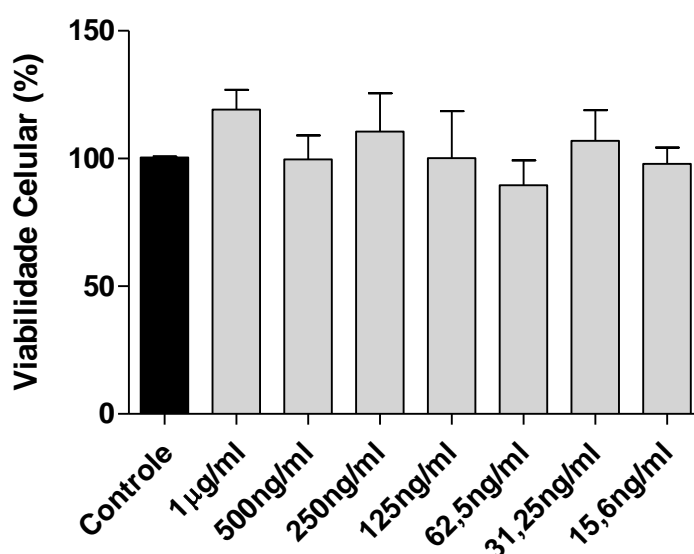


Figura1. Análise da viabilidade celular de macrófagos tratados com diferentes concentrações de ExtTs. Células J774 foram cultivadas em placa de 96 poços em meio DMEN com 10% SFB e após 24 hs, foram tratadas com diferentes concentrações do ExtTs (1 µg/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62,5 ng/ml, 31,25ng/ml e 15,6 ng/ml). Após 24 hs de tratamento, a viabilidade celular foi verificada pelo ensaio do MTT. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle (células não tratadas = 100% de viabilidade).

5.2. O tratamento com diferentes concentrações do extrato de *T. stromaticum* diminui a produção de NO em macrófagos J774 infectados com *T. gondii*

Como um indicativo da produção de NO, os níveis de nitrito foram mensurados no sobrenadante de macrófagos J774 tratados ou não com diferentes concentrações do extrato de *T. stromaticum* e infectados com *T. gondii*, como descrito no item 4.11 de Materiais e Métodos.

A infecção com *T. gondii* não alterou a produção de NO em macrófagos J774 e a citocina IFN- γ foi apta a induzir a produção de NO. Os macrófagos J774 tratados com as

diferentes concentrações do extrato e infectados com *T. gondii*, apresentaram menor produção de NO em relação às células infectadas e tratadas com IFN- γ . Em maiores concentrações 1 μ g/ml de ExtTs, o tratamento diminuiu a produção de NO em comparação entre células não tratadas (meio), assim como em comparação com células infectadas e não tratadas (Figura 2).

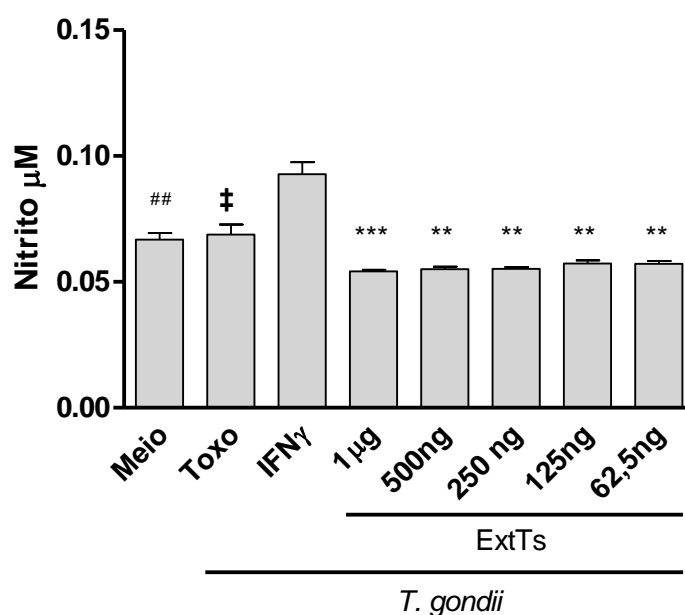


Figura 2. Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774 tratados com extrato de *T. stromaticum* e infectados com *T. gondii*. Células J774 foram tratadas ou não, com cinco diferentes concentrações do extrato de *T. stromaticum* e infectadas com 5 parasitas por célula de *T. gondii*. Células J774 cultivadas apenas com meio ou células não tratadas e infectadas com *T. gondii*, representaram condições de controle do experimento. A produção de óxido nítrico foi dosada no sobrenadante de cultura através da reação de Griess. A reação foi avaliada em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 540 nm. Os dados são representativos de dois experimentos independentes realizados em sextuplicada para cada condição. *comparação entre células tratadas com diferentes concentrações do ExtTs e tratadas com IFN- γ ; #comparação entre células não tratadas (meio) e tratadas com 1 μ g/ml do ExtTs; ‡ comparação entre células somente infectadas e tratadas com 1 μ g/ml de ExtTs. (Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn, **p<0,01 e ***p<0,001).

5.3 O efeito do tratamento com diferentes concentrações do extrato de *T. stromaticum* sobre a proliferação intracelular de *Toxoplasma gondii* em macrófagos J774

Os efeitos do tratamento com diferentes concentrações do extrato do fungo de *T. stromaticum* (1 μ g/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml e 62,5 ng/ml), sobre a proliferação intracelular de *T. gondii*, foram avaliados sob três condições experimentais.

O tratamento das células com diferentes concentrações do ExtTs antes da infecção com *T. gondii* (Figura 3A ou após a infecção (Figura 3B), não alterou a proliferação de *T. gondii*, quando comparado ao grupo não tratado (Figura 3A-B). Quando as células foram tratadas com IFN- γ e infectadas com *T. gondii*, observou-se que a citocina foi capaz de controlar a proliferação do parasito (Figura 3A). Entretanto, quando os taquizoítas de *T. gondii* foram tratados com diferentes concentrações do ExtTs por 1 hora antes da infecção dos macrófagos J774, observou-se uma diminuição da proliferação do parasito de maneira dependente da concentração do ExtTs ($p < 0,05$) (Figura 3-C).

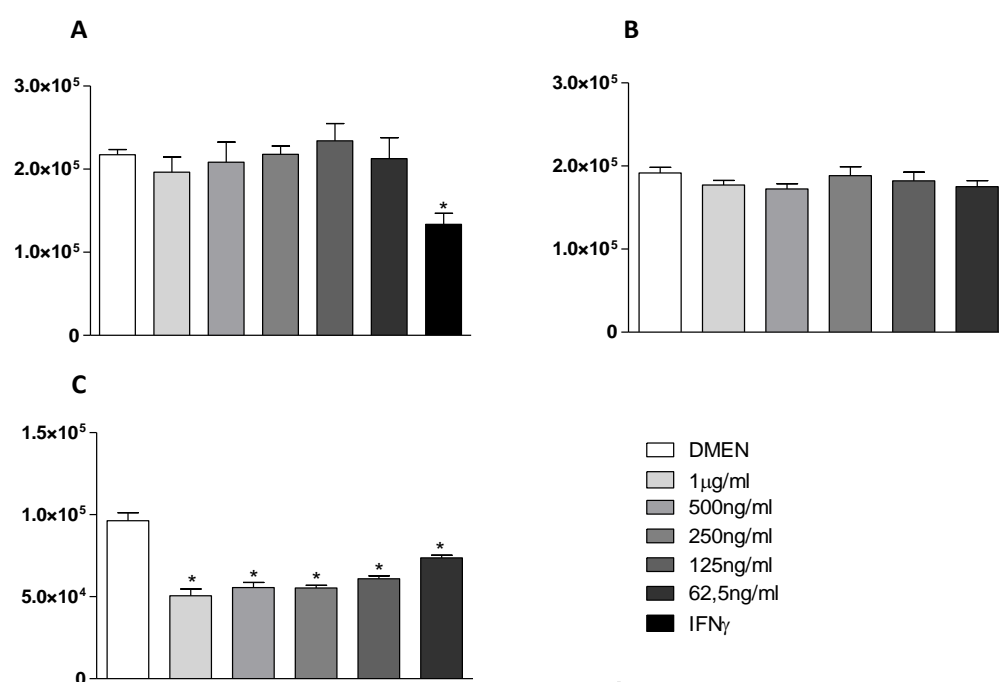


Figura 3: Proliferação intracelular de *Toxoplasma gondii* em células J774. A proliferação de *T. gondii* foi analisada em três diferentes condições: (A) células J774 pré-tratadas com ExtTs antes da infecção com *T. gondii*. (B) Células J774 infectadas com *T. gondii* e depois tratadas com ExtTs. (C) taquizoítas de *T. gondii* pré-tratados por 1 h com ExtTs e infecção de células J774 com esses parasitos pré-tratados. A atividade enzimática de β -galactosidase foi revelada com a adição de substrato CPRG e a absorbância foi mensurada à 570 nm em leitor de placas. Os dados foram expressos como média \pm SEM do número de taquizoítas em relação à curva padrão e são representativos de três experimentos independentes para cada condição em sextuplicata. ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, $p < 0,05$).

5.4 Quantificação de DNA de *T. gondii* por PCR Tempo Real (qPCR)

Similarmente ao observado nos dados da proliferação intracelular parasitária, nossos resultados mostraram uma drástica redução na quantidade de DNA *T. gondii* nas

células infectadas com parasitos previamente tratados com ExtTs em comparação aos parasitos não tratados (Figura 4).

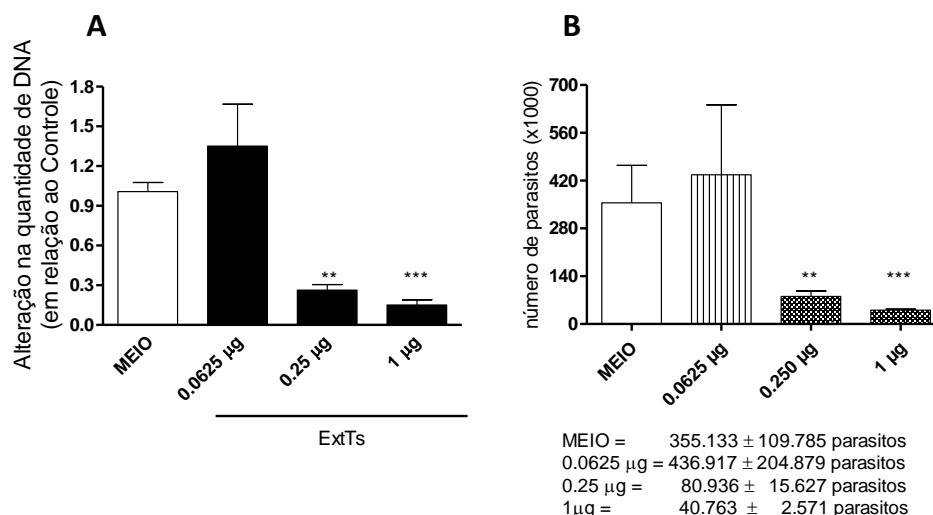


Figura 4: Quantificação de DNA de *T. gondii* por PCR (qPCR): O parasitismo de células J774 infectadas com a cepa RH-2F1 de *T. gondii* previamente tratado com ExtTs, foi realizado pela quantificação de DNA usando PCR em tempo real. As reações de qPCR foram realizadas em triplicata a partir de três experimentos independentes com SYBR Green (Applied Biosystem). O ExtTs diminui o parasitismo de *T. gondii* (cepa RH-2F1) previamente tratado em macrófagos J774 macrófagos de maneira dose-dependente. (A) Detecção do parasito por qPCR em cada amostra comparado ao controle. O fragmento 529S foi utilizado para quantificar o parasita e β -actina foi utilizada para normalizar a quantidade de DNA genômico das células J774. (B) Razão absoluta do número de parasitos pelo valor do fragmento Amplicom CT 529S de *T. gondii* gerado pela qPCR ($p < 0,0001$). One Way ANOVA (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$)

5.4 Níveis das citocinas, IL-12, TGF- β , TNF e IL-10 nos sobrenadantes de cultura de macrófagos J774 tratados ou não com diferentes concentrações do extrato e infectados ou não com *T. gondii*

A produção de citocinas foi analisada no sobrenadante de cultura de macrófagos J774 previamente tratados ou não com diferentes concentrações do extrato de *T. stromaticum* e após 24 horas do tratamento, infectados ou não com *T. gondii*.

Não foi observado diferença estatística na produção das citocina IL-10 e IL-12 entre as células tratadas com ExtTs infectadas ou não por *T. gondii* (Figura 5 A e C).

Em relação à produção de TGF- β , nossos resultados demonstraram que o tratamento com ExtTs aumentou a produção dessa citocina nas células não infectadas. Além disso, foi observado que o tratamento das células J774 com IFN- γ induziu um aumento na produção de TGF- β (Figura 5B). Na presença da infecção por *T. gondii*, ocorre um decréscimo na produção dessa citocina quando comparado às células tratadas e não infectadas (Figura 5B). O tratamento das células J774 com IFN- γ induziu um

aumento na produção de TNF e a infecção de macrófagos com *T. gondii* aumentou ainda mais os níveis de detecção da citocina (Figura 5D). A produção de TNF em macrófagos tratados com ExtTs e infectados ou não com *T. gondii*, diminui drasticamente quando comparado às células tratadas com IFN- γ antes da infecção (Figura 5D).

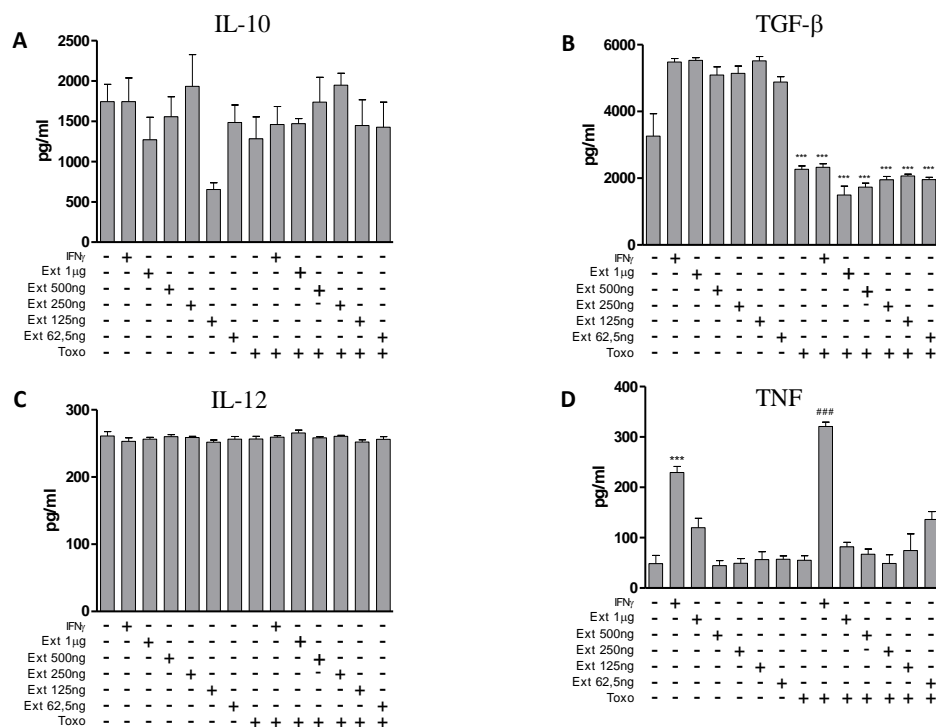


Figura 5: Perfil de citocinas mensurado no sobrenadante de cultura de macrófagos J774: A produção de citocinas foi analisada no sobrenadante de cultura de macrófagos J774 após 24 horas do tratamento com diferentes concentrações do ExtTs, infectados com *T. gondii* (mais detalhes ver Materiais e Métodos). O nível de IL-10, TGF- β , IL-12 e TNF é visto respectivamente e A, B, C e D. *** indica diferença estatística entre os grupos infectados e o grupo tratado com IFN- γ não infectado e ### indica diferença entre o grupo infectado e tratado com INF- γ e os diferentes grupos infectados e tratados com ExtTs. ***p \leq 0,001, ### p \leq 0,001 (OneWay Anova com pós teste de Bonferroni)

5.5 O tratamento com extrato de *T. stromaticum* diminui a formação de vesículas autofágicas em macrófagos J774 infectados com *T. gondii*

Como um mecanismo adicional para verificar a influência de ExtTs em células J774 infectadas ou não com o parasito, aqui nós realizamos o ensaio de visualização de autofagia com o MDC (monodansilcadaverina) nas células J774 tratadas ou não com ExtTs e infectadas com *T. gondii*. Os macrófagos J774 sem tratamento e infecção, apresentam uma autofagia basal (Figura 6, painel superior esquerdo). A infecção com *T.*

gondii aparentemente induziu um ligeiro aumento na formação das vesículas autofágicas como demonstrado na Figura 6, painel superior direito.

Foi observado que o tratamento prévio das células com 250 e 500 ng/ml do ExtTs diminuiu a formação das vesículas autofágicas nos macrófagos infectados ou não pelo *T. gondii* (Figura 6, painéis inferiores a esquerda e direita). Porém, quando infectadas com *T. gondii* e tratadas com 500 ng/ml do ExtTs observou a detecção apesar de ser em menor proporção de vesículas autofágicas (Figura 6, painel inferior a direita). Células tratadas com Wortmanin, um inibidor autofágico conhecido, apresentaram uma total ausência de vesículas autofágicas (Figura 6).

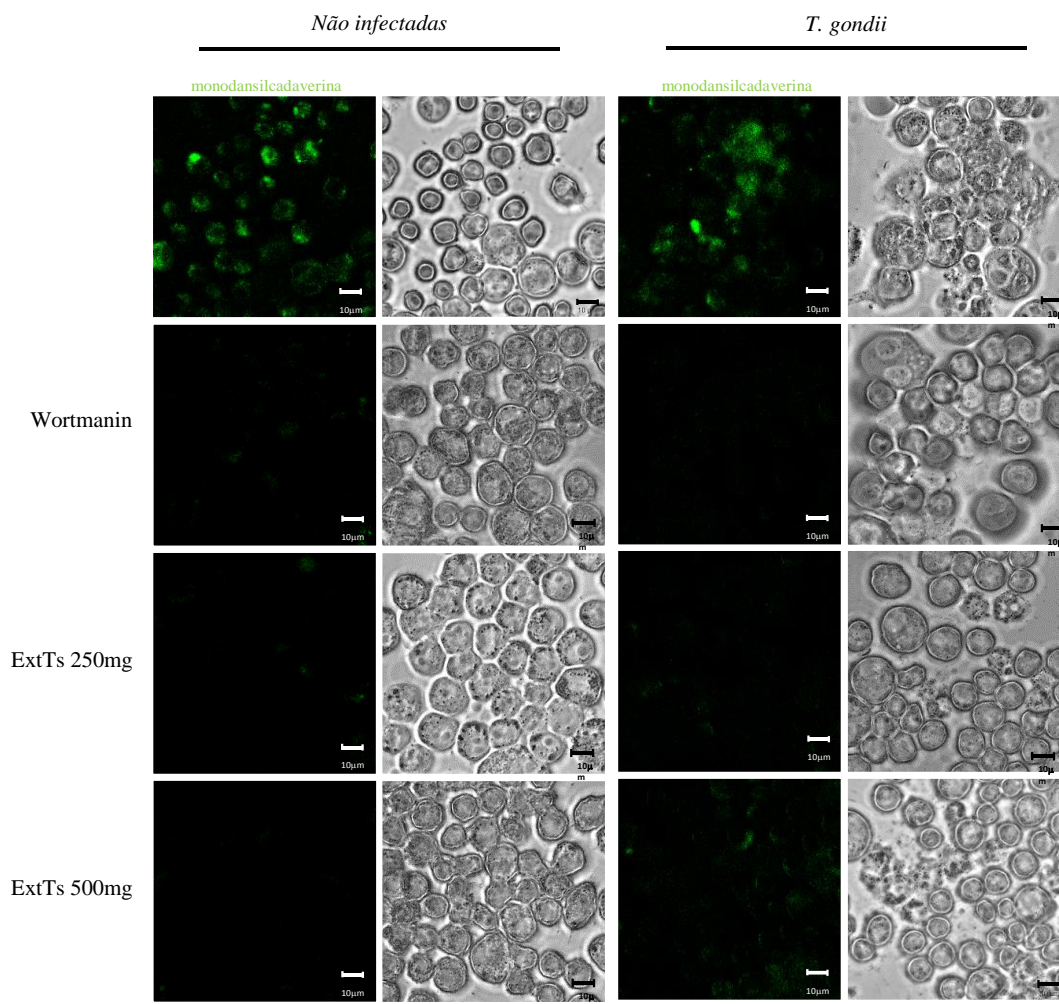


Figura 6: Detecção de autofagia em macrófagos J774 por monodansilcadaverina. Células J774 (4×10^4) foram tratadas com ExtTs ou IFN- γ e infectadas com *T. gondii* (5:1). A droga inibidora de autofagia, Wortmanin, foi usada como controle negativo. Posteriormente, as células controle e tratadas foram incubadas com MDC durante 1h a 37°C. Os vacúolos autofágicos foram observados pela coloração verde (MDC) em células vivas. Barra 10 μ m.

5.6 O tratamento de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* antes da inoculação de camundongos protege os animais contra a mortalidade

A fim de avaliar *in vivo* o efeito do pré-tratamento dos parasitos com ExtTs, camundongos C57/BL6 foram infectados com 100µl contendo 1×10^3 parasitos da cepa RH de *T. gondii* que foram previamente tratados por 1 hora a 37°C com 1µg/ml do extrato e foram observados quanto à sobrevivência e perda de peso. Todos os camundongos infectados com parasitos tratados como acima descrito morreram aos 8 dias de infecção (Figura 7A). Então, realizamos um segundo experimento onde os parasitos foram tratados com uma concentração maior do ExtTs (2µg/ml) e por um período tempo maior (3 horas). De forma interessante todos os animais infectados com parasitos previamente tratados com maior concentração de ExtTs por 3hs sobreviveram por 30 dias de infecção (Figura 7B). Entretanto, todos os animais infectados com os parasitos não tratados mantidos a 37°C por 3hs morreram aos 8 dias após a infecção (Figura 7B) ($P < 0,05$).

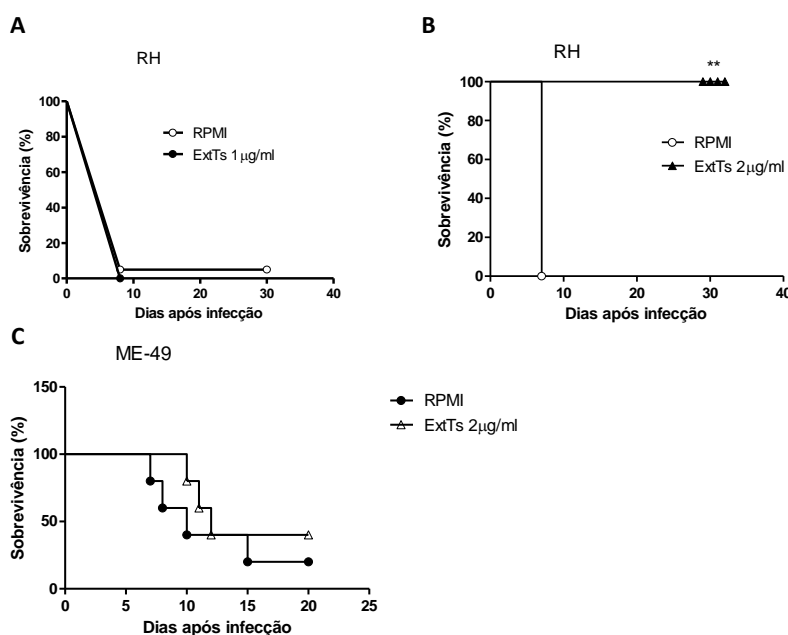


Figura 7: O pré-tratamento de taquizoítos de *T. gondii* com ExtTs protege os animais quanto a mortalidade: Camundongos C57BL/6 foram inoculados intraperitonealmente com taquizoítos de RH ou bradizoítos de ME-49 de *T. gondii* pré-tratados com ExtTs ou meio RPMI e foram observados quanto à sobrevivência. A) 1×10^3 parasitos foram pré-tratados por 1 hora a 37°C com 1µg/ml do extTs ou meio RPMI e inoculados nos animais. B) 3×10^4 parasitos foram pré-tratados por 3 horas a 37°C com 2µg/ml do extTs ou meio RPMI e inoculados nos animais. C) 5×10^4 parasitos foram pré-tratados por 1 hora a 37°C com 2µg/ml do extTs ou meio RPMI e inoculados nos animais ($P < 0,05$) (Teste do Quiquadrado (χ^2) e long-rank teste).

6. DISCUSSÃO

T. gondii é um parasito intracelular obrigatório capaz de infectar qualquer célula nucleada do hospedeiro. Sua distribuição é cosmopolita e estima-se que um terço da população mundial tenha anticorpos circulantes contra este parasito (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). A ingestão de água ou alimentos contaminados por oocistos facilita a transmissão da infecção, principalmente em áreas de baixas condições sócio-econômicas, nas quais as taxas de prevalência do parasito chegam a 70% (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Devido a sua importância médica direcionada a grupos como gestantes e imunocomprometidos, nos quais os efeitos da infecção são mais acentuados podendo ocasionar grave sintomatologia, inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas no intuito de estabelecer novas ou alternativas estratégias terapêuticas contra *T. gondii*. Tipicamente, as opções de tratamento são a pirimetamina e sulfadiazina, no entanto a sua utilidade é limitada por causa da alta citotoxicidade e os graves efeitos colaterais. Por esses motivos, novas drogas com menor toxicidade são urgentemente necessárias. Neste sentido, alguns estudos têm utilizado extratos de plantas ou de fungos como potentes alvos terapêuticos contra *T. gondii*, como o trabalho realizado por Jiang e colaboradores (2008), que usou a oleuropeína, uma molécula isolada a partir *Fraxinus rhynchophylla*, como um inibidor da proliferação de *T. gondii* (JIANG *et al.*, 2008). O objetivo geral destes estudos é estabelecer medidas terapêuticas novas e mais eficazes, que possam atuar contra todos os estágios evolutivos de *T. gondii* e que apresentem pouco efeito adverso ao indivíduo (FERREIRA *et al.*, 2006; LANS *et al.*, 2007; PETERSEN, 2007).

Em nosso trabalho, demonstramos alguns dos efeitos do extrato do fungo *T. stromaticum* na infecção por *T. gondii*. Primeiramente, avaliamos o efeito citotóxico do ExtTs em macrófagos J774, pelo ensaio de viabilidade celular. Essa análise é um ponto importante a ser avaliado já que extratos de plantas ou de fungos podem interferir na viabilidade das células. Oliveira e colaboradores (2007) demonstraram que o tratamento com o extrato total de *Artemisia annua* apresentou baixa toxicidade para fibroblastos humanos da linhagem HFF (DE OLIVEIRA *et al.*, 2009). Nossos dados em macrófagos J774 tratados com diferentes doses do ExtTs (1 µg/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62,5 ng/ml, 31,25ng/ml e 15,6 ng/ml) demonstraram nenhuma alteração na sua viabilidade celular quando comparados às células não tratadas. De maneira interessante, observa-se uma tendência de aumento da viabilidade celular em todas as concentrações

do ExtTs, provando que o mesmo não é citotóxico para a célula. Outros trabalhos também demonstraram o uso de extratos de plantas para tratamento de infecções causadas por outros parasitos e que não prejudicaram a viabilidade das células, como o uso do extrato de *Pterocaulon polystachyum* que apresentou alta capacidade amebicida contra trofozoítos de *Ameba castellani in vitro* (RODIO et al., 2008) e o tratamento de *Trypanosoma cruzi* com o extrato de *Centroceras clavulatum*, onde uma eficiente atividade antiparasitária contra esse parasito foi detectada (ROCHA et al., 2011).

Para avaliarmos o perfil de citocinas e a produção de NO, macrófagos J774 foram tratados com diferentes concentrações do ExtTs, infectados ou não com *T. gondii* e os sobrenadantes foram avaliados em relação à produção de citocinas e nitrito. Nossos resultados mostram que todas as concentrações do ExtTs foram capazes de diminuir a produção de NO. Os intermediários de NO, são moléculas apolares produzidas por várias células da imunidade inata, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, que facilmente atravessam a membrana do vacúolo parasitóforo atingindo diretamente o parasito (YAROVINSKY, 2014), apresentando um importante papel na resistência inata do hospedeiro frente à infecção por *T. gondii* (MILLER et al., 2009). Os resultados do presente estudo estão de acordo com Alves-Filho e colaboradores (2011) que também demonstraram que os esporos de *T. stromaticum* inibiram a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de NO em ensaios *in vitro* com fagócitos do sistema imune inato.

Em relação à produção de citocinas no sobrenadante dos macrófagos J774 tratados com ExtTs e infectados ou não com *T. gondii*, nossos resultados demonstraram que o tratamento com ExtTs não alterou os níveis de produção de IL-12 e IL-10. Em relação a TGF- β 1, verificamos que o tratamento com ExtTs, sem a presença da infecção por *T. gondii*, induziu a um aumento na produção desta citocina pelos macrófagos J774, contudo, a infecção por *T. gondii* foi capaz de reverter esse efeito. Sabe-se que TGF- β está envolvido na diferenciação de células T reguladoras tendo um importante papel no controle inflamatório e manutenção da homeostase intestinal (GORELIK; CONSTANT; FLAVELL, 2002). Na presença da infecção por *T. gondii*, essa citocina está envolvida no controle da inflamação e dos danos imunopatológicos na mucosa intestinal (BUZONI-GATEL et al., 2001), evidenciando sua função imunomodulatória na presença de agentes infecciosos como *T. gondii*. TGF- β é vital na proteção contra ileíte, sendo sua proteção mediada pela inibição da produção de IFN- γ por células T CD4⁺ intestinais. Linfócitos intraepiteliais de camundongos imunizados produzem grandes quantidades de TGF- β e a

sua inibição anula o efeito protetor, o que resulta no desenvolvimento de doença intestinal em linhagens de camundongos resistentes (Kasper *et al.*, 2004). Nossos dados demonstram que em células J774 o efeito de *T. gondii* em inibir a produção de TGF- β é mais potente que o estímulo de ExtTs no aumento de produção da citocina.

O tratamento com ExtTs nos macrófagos infectados com *T. gondii* não interferiu na produção da citocina TNF quando comparados com as células infectadas e não tratadas. Nota-se que há um aumento na produção dessa citocina nos macrófagos tratados com 1 μ g/ml ExtTs sem infecção, esse aumento não é observado com as outras concentrações do ExtTs. TNF- α é uma importante citocina induzida em resposta ao *T. gondii*, com papel crucial na eliminação do parasito por induzir a diferenciação, proliferação e ativação de leucócitos que induz a (BUTLER; HARRIS; BLADER, 2013).

O próximo passo foi verificar se o tratamento dos macrófagos J774 com ExtTs antes da infecção por *T. gondii* iria interferir na formação de vesículas autofágicas. Um estudo recente demonstrou que *T. gondii* induziu autofagia nas células infectadas para sua proliferação intracelular (GAO *et al.*, 2014). Além disso, o parasito é capaz de explorar a autofagia celular para proteção e replicação no vacúolo parasitóforo e inibição da fusão desse vacúolo com o lisossoma (ORLOFSKY, 2009). Nossos dados, entretanto, mostraram que o tratamento dos macrófagos J774 com 250ng/ml ou 500 ng/ml de ExtTs antes da infecção por *T. gondii* induziu a uma menor formação de vesículas autofágicas quando comparadas aos macrófagos tratados somente com meio, infectados ou não pelo parasito. Nesse ensaio, o composto Wortmaninn, um inibidor de autofagia, foi usado como controle da inibição da formação de vesículas autofágicas nesse experimento. O tratamento com as duas concentrações do ExtTs apresentou um resultado muito parecido com os macrófagos tratados com o inibidor de autofagia. Portanto, no presente trabalho não fica claro se com a diminuição das vesículas, também houve diminuição na proliferação do parasito nesse fenótipo celular. Apesar de ser observado uma diminuição na autofagia, o tratamento das células com ExtTs na interferiu na proliferação dos parasitos.

A análise da proliferação intracelular *in vitro* foi realizada em três diferentes condições. Nossos resultados demonstraram que o tratamento prévio dos taquizoítos de *T. gondii* com as diferentes concentrações do ExtTs (1 μ g/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml e 62,5 ng/ml) antes da infecção, diminuiu drasticamente a proliferação intracelular de *T. gondii* nos macrófagos J774 quando comparados ao grupo controle, o mesmo não

foi observado nos macrófagos tratados com ExtTs antes ou depois da infecção. Para confirmar a menor proliferação parasitária visto com o pré-tratamento dos parasitos antes da infecção, foi realizado um ensaio de quantificação do DNA de *T. gondii* por ensaio de PCR quantitativo. Os macrófagos J774 infectados com os parasitos tratados previamente com diferentes concentrações do ExtTs apresentaram uma menor quantidade de DNA do parasito quando comparados ao grupo controle, comprovando que o tratamento prévio dos taquizoítos de *T. gondii* com diferentes concentrações do ExtTs é eficaz em diminuir a proliferação parasitária.

Como descrito por Alves-Filho e colaboradores (2011), o tratamento de fagócitos do sistema imune inato com esporos do fungo *T. stromaticum* induz a uma imunossupressão, com diminuição de ROS, NO e IFN- γ , nós esperávamos que o tratamento dos macrófagos J774 com diferentes concentrações do ExtTs, aumentaria a proliferação de *T. gondii* sabendo a importância dessa resposta para eliminação do parasito. Surpreendentemente, os nossos resultados não mostraram esse aumento da proliferação do parasito, quando as células foram tratadas antes da infecção. Diante disso, decidimos tratar os taquizoítos da cepa RH-2F1 de *T. gondii* com as diferentes concentrações do ExtTs antes da infecção dos macrófagos J774. Como o tratamento resultou em uma significativa diminuição da proliferação de *T. gondii* nós fomos avaliar o efeito do pré-tratamento dos parasitos em ensaios *in vivo*. Oliveira e colaboradores (2009), demonstraram que o extrato total de *A. annua* foi capaz de controlar parcialmente a infecção por *T. gondii* em experimentos *in vitro*, sendo que este efeito foi mais fortemente observado no pré-tratamento dos parasitos antes da infecção celular (DE OLIVEIRA *et al.*, 2009) e em outro trabalho utilizando drogas comumente usadas na terapia contra toxoplasmose, a enrofloxacin foi mais protetora contra *T. gondii* em células HFF infectadas do que o tratamento com sulfadiazina (BARBOSA *et al.*, 2012).

Para avaliarmos o efeito desse pré-tratamento dos taquizoítos *in vivo*, nos inoculamos parasitos tratados com a mesma concentração de ExtTs usado nos ensaios *in vitro* (1 μ g/ml por 1 hr) em camundongos Swiss, esses foram observados quanto a sua sobrevivência e perda de peso. Observamos que todos animais de ambos os grupos morreram 8 dias após infecção. Diante desses resultados, aumentamos a concentração de ExtTs para tratar os parasitos, bem como o tempo de tratamento. Nesse segundo ensaio *in vivo*, os animais que receberam os parasitos tratados por 3 horas com 2 μ g/ml de ExtTs e apresentaram uma maior taxa de sobrevivência (100%) quando comparados ao grupo

controle, onde os parasitos foram tratados somente com meio RPMI. Os animais que sobreviveram foram sacrificados após 30 dias da infecção. Já é bem conhecido que a infecção de camundongos com a cepa RH de *T. gondii* leva os animais à morte entre 7-9 dias, porém em alguns tratamentos o aumento da sobrevivência pode não ultrapassar os 20 dias de infecção (HASSAN *et al.*, 2014). Em nosso estudo, o pré-tratamento do parasito com ExtTs prejudicou a proliferação do parasito *in vitro* e *in vivo* e evitou a morte dos animais, indicando que pode ter ocorrido uma diminuição da proliferação. Em paralelo, iniciamos experimentos para verificar o efeito de ExtTs 2 µg/ml em bradizoitas de *T. gondii* utilizando a cepa ME-49, porém, não obtivemos uma melhora significativa na sobrevivência de camundongos C57BL/6, provavelmente devido ao fato que os parasitos foram tratados por 1 hora e não 3 horas como observado para a cepa RH2F1 de *T. gondii*. Experimentos adicionais são necessários para esclarecer esse resultado.

Experimentos *in vivo* demonstraram que a enrofloxacin diminuiu significativamente o parasitismo tecidual, bem como as alterações inflamatórias no cérebro de *Calomys Callosus* infectados com *T. gondii* quando comparada com os animais não tratados (BARBOSA *et al.*, 2012). Contudo, o resultado de sobrevivência observada nesses estudos não tão significativo quando comparado ao que foi observado com os resultados do tratamento com ExtTs.

O presente estudo demonstra que ExtTs é capaz de diminuir a virulência de *T. gondii*, e poderia ser avaliado com uma estratégia potencial para tratamento da infecção por *T. gondii* e controle da toxoplasmose.

7. CONCLUSÃO

- O extrato do fungo *T. stromaticum* não demonstrou ser citotóxico para os macrófagos J774 em nenhuma das concentrações utilizadas nesse trabalho.

- O tratamento prévio de macrófagos J774 com diferentes concentrações do extrato diminuiu a produção de óxido nítrico durante a infecção por *T. gondii*.

- O tratamento com o extrato *T. stromaticum* não interferiu significativamente no perfil das citocinas IL-10, IL-12p70 e TNF em macrófagos J774 durante a infecção por *T. gondii*. Na ausência da infecção, o extrato induziu a produção da citocina TGF- β .

- O ExtTs induziu a uma menor formação de vesículas autofágicas em macrófagos J774 previamente tratados com 250ng/ml e 500ng/ml do ExtTs e infectados com *T. gondii*.

- O tratamento de taquizoítos da cepa RH-2F1 de *T. gondii* com ExtTs anterior à infecção, diminuiu drasticamente a proliferação intracelular parasitária em macrófagos J774 e *in vivo*, esse mesmo tratamento evitou a mortalidade de camundongos C57BL/6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALVES-FILHO, E. R.; MAIOLI, T. U.; FARIA, A. M.; NORONHA, F. S.; SILVA, N. M.; COSTA, M. G.; SANTOS, J. L. The biocontrol fungus *Trichoderma stromaticum* downregulates respiratory burst and nitric oxide in phagocytes and IFN-gamma and IL-10. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, 74, 943-958,2011.

ANDRADE, W. A.; SOUZA MDO, C.; RAMOS-MARTINEZ, E.; NAGPAL, K.; DUTRA, M. S.; MELO, M. B.; BARTHOLOMEU, D. C.; GHOSH, S.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. **Cell Host Microbe**, 13, 42-53,2013.

BASTOS, C.N. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicioso*. Brazilian phytopathology. v. 21, p. 50-54. 1996.

BASTOS, C.N.; DIAS, J.C. Reduction in the Production of basidiocarps of *Crinipellis pernicioso* by *Trichoderma viride*. **Summa Phytopathologica**. v.18, p. 235-238. 1992.

BARBOSA, B. F.; GOMES, A. O.; FERRO, E. A.; NAPOLITANO, D. R.; MINEO, J. R.; SILVA, N. M. Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in both in vitro and in vivo experimental models. **Veterinary Parasitology**, 187, 44-52,2012.

BELA, S. R.; DUTRA, M. S.; MUI, E.; MONTPETIT, A.; OLIVEIRA, F. S.; OLIVEIRA, S. C.; ARANTES, R. M.; ANTONELLI, L. R.; MCLEOD, R.; GAZZINELLI, R. T. Impaired innate immunity in mice deficient in interleukin-1 receptor-associated kinase 4 leads to defective type 1 T cell responses, B cell expansion, and enhanced susceptibility to infection with *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, 80, 4298-4308,2012.

BENHAMOU, N.; CHET, I. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*- ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. **Phytopathology**. v.83, p. 1062 –1071, 1993.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiol Molecular Biology Reviews**, 64, 607-623,2000.

BOOTHROYD, J. C.; DUBREMETZ, J. F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nature Reviews Microbiology**, 6, 79-88,2008.

BRADLEY, P. J.; WARD, C.; CHENG, S. J.; ALEXANDER, D. L.; COLLIER, S.; COOMBS, G. H.; DUNN, J. D.; FERGUSON, D. J.; SANDERSON, S. J.; WASTLING, J. M.; BOOTHROYD, J. C. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biology Chemistry**, 280, 34245-34258,2005.

BRUNET, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. **International Immunopharmacology**, 1, 1457-1467,2001.

BUTLER, N. S.; HARRIS, T. H.; BLADER, I. J. Regulation of immunopathogenesis during *Plasmodium* and *Toxoplasma* infections: more parallels than distinctions? **Trends in Parasitology**, 29, 593-602,2013.

BUZONI-GATEL, D.; DEBBABI, H.; MENNECHET, F. J.; MARTIN, V.; LEPAGE, A. C.; SCHWARTZMAN, J. D.; KASPER, L. H. Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. **Gastroenterology**, 120, 914-924,2001.

CAMPOS, F. F.; ROSA, L. H.; COTA, B. B.; CALIGIORNE, R. B.; RABELLO, A. L.; ALVES, T. M.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). **PLoS Neglected Tropical Disease**, 2, e348,2008.

CANEDO-SOLARES, I.; GALVAN-RAMIREZ MDE, L.; LUNA-PASTEN, H.; RODRIGUEZ PEREZ, L. R.; ORTIZ-ALEGRIA, L. B.; RICO-TORRES, C. P.; VELA-AMIEVA, M.; PEREZ-ANDRADE, M.; FIGUEROA-DAMIAN, R.; CORREA, D. Congenital toxoplasmosis: specific IgG subclasses in mother/newborn pairs. **Pediatrics Infection Disease Journal**, 27, 469-474,2008.

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, 81, 111-122,2002.

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

CHARDES, T.; VELGE-ROUSSEL, F.; MEVELEC, P.; MEVELEC, M. N.; BUZONI-GATEL, D.; BOUT, D. Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice. **Immunology**, 78, 421-429,1993.

CHEN, X.; XIE, S.; BHAT, S.; KUMAR, N.; SHAPIRO, T. A.; LIU, J. O. Fumagillin and fumarranol interact with *P. falciparum* methionine aminopeptidase 2 and inhibit malaria parasite growth in vitro and in vivo. **Chemistry Biology**, 16, 193-202,2009.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, 1, 1397-1406,2001.

COPPENS, I.; DUNN, J. D.; ROMANO, J. D.; PYPAERT, M.; ZHANG, H.; BOOTHROYD, J. C.; JOINER, K. A. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. **Cell**, 125, 261-274,2006.

CORREA, D.; CANEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRIA, L. B.; CABALLERO-ORTEGA, H.; RICO-TORRES, C. P. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. **Parasite Immunology**, 29, 651-660,2007.

DE OLIVEIRA, T. C.; SILVA, D. A.; ROSTKOWSKA, C.; BELA, S. R.; FERRO, E. A.; MAGALHAES, P. M.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii*: effects of *Artemisia annua* L. on susceptibility to infection in experimental models *in vitro* and *in vivo*. **Experimental Parasitology**, 122, 233-241,2009.

DEFRANCE, T.; VANBERVLIET, B.; BRIERE, F.; DURAND, I.; ROUSSET, F.; BANCHEREAU, J. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. **Journal of Experimental Medicine**, 175, 671-682,1992.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, 11, 569-588,1998.

DIAZ, S.; ZINKER, S.; RUIZ-HERRERA, J. Alterations in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* induced by the alpha sex factor or a mutation in the cell cycle. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 61, 269-276,1992.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Parasitology**, 28, 1019-1024,1998.

DUMETRE, A.; DUBEY, J. P.; FERGUSON, D. J.; BONGRAND, P.; AZAS, N.; PUECH, P. H. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. **Proceedings National Academy of Science of U S A**, 110, 11535-11540,2013.

ESPOSITO, E.; DA SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews Microbiology**, 24, 89-98,1998.

FERREIRA, R. A.; OLIVEIRA, A. B.; RIBEIRO, M. F.; TAFURI, W. L.; VITOR, R. W. *Toxoplasma gondii*: in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1,4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine. **Experimental Parasitology**, 113, 125-129,2006.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Institute Superiore di Sanita**, 40, 71-80,2004.

FOURMAUX, M. N.; ACHBAROU, A.; MERCEREAU-PUJALON, O.; BIDERRE, C.; BRICHE, I.; LOYENS, A.; ODBERG-FERRAGUT, C.; CAMUS, D.; DUBREMETZ, J. F. The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. **Molecular Biochemistry Parasitology**, 83, 201-210,1996.

FRENKEL, J. K. Letter: Cytomegalovirus infection and toxoplasma. **American Journal of Disease Children**, 126, 860-861,1973.

GAO, D.; ZHANG, J.; ZHAO, J.; WEN, H.; PAN, J.; ZHANG, S.; FANG, Y.; LI, X.; CAI, Y.; WANG, X.; WANG, S. Autophagy activated by *Toxoplasma gondii* infection in turn facilitates *Toxoplasma gondii* proliferation. **Parasitology Research**, 113, 2053-2058,2014.

GAZZINELLI, R. T.; BALA, S.; STEVENS, R.; BASELER, M.; WAHL, L.; KOVACS, J.; SHER, A. HIV infection suppresses type 1 lymphokine and IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* but fails to inhibit the synthesis of other parasite-induced monokines. **Journal of Immunology**, 155, 1565-1574,1995.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nature Reviews Immunology**, 6, 895-906,2006.

GAZZINELLI, R. T.; MENDONCA-NETO, R.; LILUE, J.; HOWARD, J.; SHER, A. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: an evolutionary tale of mice, cats, and men. **Cell Host and Microbe**, 15, 132-138,2014.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E. Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal Immunology**, 153, 2533-2543,1994.

GORELIK, L.; CONSTANT, S.; FLAVELL, R. A. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. **Journal of Experimental Medicine**, 195, 1499-1505,2002.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal in Biochemistry**, 126, 131-138,1982.

HAMMOUDA, N. A.; RASHWAN, E. A.; HUSSIEN, E. D.; ABO EL-NAGA, I.; FATHY, F. M. Measurement of respiratory burst of TNF and IL-1 cytokine activated murine peritoneal macrophages challenged with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Egyptian Society Parasitology**, 25, 683-691,1995.

HASSAN, I. A.; WANG, S.; XU, L.; YAN, R.; SONG, X.; XIANGRUI, L. Immunological response and protection of mice immunized with plasmid encoding *T. gondii* glycolytic enzyme Malate Dehydrogenase. **Parasite Immunology**, 2014.

HAUSWIRTH, D. W.; SUNDY, J. S. Bioaerosols and innate immune responses in airway diseases. **Current Opinion in Allergy Clinical Immunology**, 4, 361-366,2004.

HAVAUX, X.; ZEINE, A.; DITS, A.; DENIS, O. A new mouse model of lung allergy induced by the spores of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum* molds. **Clinical Experimental Immunology**, 139, 179-188,2005.

HERRERA-ESTRELLA, A.; CHET, I. Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi. In: Altman A. ed. Agricultural biotechnology, Marcel /dekker Inc. p. 263-282, 1998.

HUSKINSON, J.; STEPICK-BIEK, P. N.; ARAUJO, F. G.; THULLIEZ, P.; SUZUKI, Y.; REMINGTON, J. S. *Toxoplasma* antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. **Journal of Clinical Microbiology**, 27, 2031-2038,1989.

JACKSON, M. H.; HUTCHISON, W. M. The prevalence and source of *Toxoplasma infection* in the environment. **Advances in Parasitology**, 28, 55-105,1989.

JIANG, J. H.; JIN, C. M.; KIM, Y. C.; KIM, H. S.; PARK, W. C.; PARK, H. Anti-toxoplasmosis effects of oleuropein isolated from *Fraxinus rhychophylla*. **Biological and Pharmacological Bulletin**, 31, 2273-2276,2008.

JOHNSON, L. L.; SAYLES, P. C. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. **Infection and Immunity**, 70, 185-191,2002.

KANG, H.; SUZUKI, Y. Requirement of non-T cells that produce gamma interferon for prevention of reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the brain. **Infection and Immunity**, 69, 2920-2927,2001.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal of Parasitology**, 34, 423-432,2004.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma*: the next 100years. **Microbes Infection**, 10, 978-984,2008.

LANS, C.; TURNER, N.; KHAN, T.; BRAUER, G. Ethnoveterinary medicines used to treat endoparasites and stomach problems in pigs and pets in British Columbia, Canada. **Veterinary Parasitology**, 148, 325-340,2007.

LEVITZ, S. M. Interactions of Toll-like receptors with fungi. **Microbes and Infection**, 6, 1351-1355,2004.

LYCKE, E.; CARLBERG, K.; NORRBY, R. Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: function of the penetration-enhancing factor of toxoplasma. **Infection and Immunity**, 11, 853-861,1975.

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

MAHITTIKORN, A.; WICKERT, H.; SUKTHANA, Y. Comparison of five DNA extraction methods and optimization of a b1 gene nested PCR (nPCR) for detection of *Toxoplasma gondii* tissue cyst in mouse brain. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, 36, 1377-1382,2005.

MAI, K.; SHARMAN, P. A.; WALKER, R. A.; KATTRIB, M.; DE SOUZA, D.; MCCONVILLE, M. J.; WALLACH, M. G.; BELLI, S. I.; FERGUSON, D. J.; SMITH,

N. C. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. **Memoral do Instituto Oswaldo Cruz**, 104, 281-289,2009.

MARTINS-DUARTE, E. S.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W.; VOMMARO, R. C. Antiproliferative activities of two novel quinuclidine inhibitors against *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 58, 59-65,2006.

MEISSNER, M.; REISS, M.; VIEBIG, N.; CARRUTHERS, V. B.; TOURSEL, C.; TOMAVO, S.; AJIOKA, J. W.; SOLDATI, D. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. **J Cell Sci**, 115, 563-574,2002.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Parasitology**, 39, 23-39,2009.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, 363, 1965-1976,2004.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunology Reviews**, 240, 269-285,2011.

ORLOFSKY, A. Toxoplasma-induced autophagy: a window into nutritional futile cycles in mammalian cells? **Autophagy**, 5, 404-406,2009.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. **Microbes and Infection**, 6, 1382-1387,2004.

PENA, H. F.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal of Parasitology**, 38, 561-569,2008.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, 12, 214-223,2007.

PETERSEN, E.; SCHMIDT, D. R. Sulfadiazine and pyrimethamine in the postnatal treatment of congenital toxoplasmosis: what are the options? **Expert Review Anti-Infective Therapy**, 1, 175-182,2003.

PLATTNER, F.; YAROVINSKY, F.; ROMERO, S.; DIDRY, D.; CARLIER, M. F.; SHER, A.; SOLDATI-FAVRE, D. *Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. **Cell Host and Microbe**, 3, 77-87,2008.

RAETZ, M.; KIBARDIN, A.; STURGE, C. R.; PIFER, R.; LI, H.; BURSTEIN, E.; OZATO, K.; LARIN, S.; YAROVINSKY, F. Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to *Toxoplasma gondii* profilin. **Journal of Immunology**, 191, 4818-4827,2013.

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

ROCHA, O. P.; DE FELICIO, R.; RODRIGUES, A. H.; AMBROSIO, D. L.; CICARELLI, R. M.; DE ALBUQUERQUE, S.; YOUNG, M. C.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Chemical profile and biological potential of non-polar fractions from *Centroceras clavulatum* (C. Agardh) Montagne (Ceramiales, Rhodophyta). **Molecules**, 16, 7105-7114,2011.

RODIO, C.; DA ROCHA VIANNA, D.; KOWALSKI, K. P.; PANATIERI, L. F.; VON POSER, G.; ROTT, M. B. In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitology Research**, 104, 191-194,2008.

SAIKAI, T.; TANAKA, H.; SATO, N.; ABE, S.; MATSUURA, A. Mushroom plant workers experience a shift towards a T helper type 2 dominant state: contribution of innate immunity to spore antigen. **Clinical Experimental Immunology**, 135, 119-124,2004.

SAMUELS, G.J.; PARDO-SCHULTHEISS, R.; HEBBAR, K.P.; LUMSDEN, R.D.; BASTOS, C.N.; COSTA, J.C.; BEZERRA, J.L. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. **Mycological Research**. v.104, p. 760-764. 2000.

SAOUROS, S.; CHEN, H. A.; SIMPSON, P.; COTA, E.; EDWARDS-JONES, B.; SOLDATI-FAVRE, D.; MATTHEWS, S. Complete resonance assignments of the C-terminal domain from MIC1: a micronemal protein from *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biomolecular NMR**, 31, 177-178,2005.

SCANGA, C. A.; ALIBERTI, J.; JANKOVIC, D.; TILLOY, F.; BENNOUNA, S.; DENKERS, E. Y.; MEDZHITOV, R.; SHER, A. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. **Journal of Immunology**, 168, 5997-6001,2002.

SINAI, A. P. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. **Subcell Biochemistry**, 47, 155-164,2008.

SINAI, A. P.; WEBSTER, P.; JOINER, K. A. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. **Journal of Cell Science**, 110 (Pt 17), 2117-2128,1997.

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitology Research**, 107, 253-260,2010.

STEYAERT, J. M.; RIDGWAY, H. J.; ELAD, Y.; STEWART, A. Genetic Basis of Mycoparasitism: A Mechanism of Biological Control by Species of *Trichoderma*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**. v. 31, n. 4, p. 281-291, 2003.

TAIT, E. D.; HUNTER, C. A. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, 104, 201-210,2009.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal of Parasitology**, 30, 1217-1258,2000.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International Journal of Parasitology**, 39, 895-901,2009.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews Immunology**, 14, 109-121,2014.

*Segundo normas da ABNT