

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Efeito imunomodulatório das lectinas de *Synadenium carinatum* (ScLL) e *Artocarpus heterophyllus* (Artin M) no controle da toxoplasmose

Leandro Peixoto Ferreira de Souza

UBERLÂNDIA, MG

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Efeito imunomodulatório das lectinas de *Synadenium carinatum* (ScLL) e *Artocarpus heterophyllus* (Artin M) no controle da toxoplasmose

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de
Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas como parte de obtenção do título de Mestre.

Leandro Peixoto Ferreira de Souza
Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

UBERLÂNDIA, MG
2015

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

S729e Souza, Leandro Peixoto Ferreira de, 1984-
2015 Efeito imunomodulatório das lectinas de *Synadenium carinatum*
 (ScLL) e *Artocarpus heterophyllus* (Artin M) no controle da
 toxoplasmose / Leandro Peixoto Ferreira de Souza. - 2015.
 70 p. : il.

 Orientador: José Roberto Mineo.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Immunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Inclui bibliografia.

 1. Immunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Lectinas -
 Teses. I. Mineo, José Roberto. II. Universidade Federal de Uberlândia.
 Programa de Pós-Graduação em Immunologia e Parasitologia Aplicadas.
 III. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Leandro Peixoto Ferreira de Souza

"Efeito imunomodulatório das lectinas de *Synadenium carinatum* (ScLI) e *Artocarpus heterophyllus* (Artin M) no controle da toxoplasmose"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 29 de maio de 2015.

Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira – UFTM

Dra. Wânia Rezende Lima – PÓS-DOC/UFU

Prof. Dr. Tiago Wilson P. Mineo – ICBIM/UFU (coordenador)

*“Combati o bom combate, terminei a corrida,
guardei a fé”.*

São Paulo (II Timóteo 4:7)

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Brunna dos Anjos Pultz Peixoto

Grande amiga e companheira que esteve comigo ao longo de toda caminhada. Sou grato pelo seu carinho e atenção, fundamentais nos momentos difíceis. Obrigado por fazer parte da minha vida.

Ao Professor Dr. José Roberto Mineo

Sobretudo pela oportunidade, por me aceitar como orientando apesar de minha pouquíssima experiência científico. A oportunidade que o Sr me proporcionou foi única, ter me colocado em contato com um mundo totalmente novo e desafiador. Obrigado

Aos professores e colaboradores deste trabalho:

A Prf^a. Dr^a Fernanda Santiago, pela paciência em ensinar princípios básicos de conduta em um laboratório de pesquisa. Sem dúvida suas ações e atitude foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr Tiago Wilson Pratiarca Mineo. Pela sabedoria nas observações feitas ao longo deste projeto, sempre com ideias e colocações pertinentes. Sua postura de trabalho e conduta com seus alunos são exemplo a serem seguidos.

A Dr^a Ana Claudia Pajuaba, pela sua atenção nos experimentos realizados. Sempre contribuindo no crescimento de todos os alunos que a procuram.

A Prof^a. Dr^a Neide Aparecida da Silva. Por Abrir as portas de seu laboratório e contribuir para a realização do trabalho. Tive a imensa felicidade em executar meu projeto sob a sua gestão como Coordenadora do nosso Programa de Pós-Graduação, sempre estando de prontidão a auxiliar os alunos que a procuravam.

A Prof^a Dr^a Maria Cristina Roque Barreira. Por confiar a mim reagentes de seu laboratório utilizados na execução do projeto. Sou imensamente grato por sua contribuição.

Aos demais colaboradores do trabalho.

Ao MSc Elieser Lucas Pires Ramos, por seus ensinamentos e paciência, vejo em você o verdadeiro espírito de professor, apaixonado pelo saber e pelo ensinar. Obrigado por toda ajuda.

Ao MSc Murilo Vieira Silva, por me ajudar em diversos experimentos, sempre disposto a ensinar e contribuir com a execução deste projeto.

Ao MSc Silas Silva Santana, pelo companheirismo na rotina do laboratório, sendo um verdadeiro mentor para mim e os demais alunos que o procuram.

Ao MSc Patrício da Silva Cardoso Barros, agradeço por sua disposição, prontamente disposto à ajudar todas as vezes que o procurei.

Aos demais companheiros de grupo, Heber Leão, Fernando Reis, Luiz Carlos Gebrim. Sempre me lembrarei dos nossos momentos de descontração, espero que continuem com o espírito sempre alegre.

Aos funcionários do laboratório de Imunologia: Marley, Max, Zilda e Cristina, que receberam com carinho todo esse tempo.

Aos meus familiares, sobretudo minha tia Lindamar Peixoto, exemplo de seriedade e conduta, por me incentivar desde cedo a traçar o caminho do estudo e do trabalho. Obrigado a Sr^a me inspira me faz querer ser um ser humano melhor.

Aos animais que foram eutanasiados em prol do desenvolvimento desta pesquisa.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	10
2 Referencial Teórico	12
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	13
2.1.1 Parasito	13
2.1.2 Morfologia e organização estrutural	14
2.1.3 Invasão à célula hospedeira.....	15
2.1.4 Ciclo de biológico e formas evolutivas	16
2.1.5 Resposta imune	18
2.1.6 Doença, Aspectos Clínicos e Epidemiologia	20
2.1.7 Tratamento	22
2.2 Lectinas	24
2.2.1 Lectina do látex de <i>Synadenium carinatum</i> (ScLL).....	26
2.2.2 Lectina da semente de <i>Artocarpus heterophylus</i> (Artin M).....	26
3 Objetivos.....	28
1 Introdução.....	28
3.1 Geral.....	29
3.2 Específicos	29
4 Material e Métodos	30
4.1 Extração das Lectinas ScLL e Artin M.....	31
4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	31
4.3 Ensaio <i>in vitro</i>	32
4.3.1 Obtenção de Macrófagos.....	32
4.3.2 Teste de Citotoxicidade	33
4.3.3 Determinação da produção de citocinas e nitrato <i>in vitro</i>	34
4.4 Ensaio <i>in vivo</i>	35

4.4.1 Teste da letalidade da dose experimental de ScLL	36
4.4.2 Obtenção dos parasitos.....	36
4.4.3 Curva de Sobrevivência	37
4.4.4 Efeito imunomodulador das lectinas ScLL e Artin M na infecção por <i>T. gondii</i> <i>in vivo</i>	38
4.4.5 Análise do parasitismo por qPCR	39
4.5 Análise Estatística.....	40
5 Resultados.....	42
5.1 Adaptação do protocolo de extração da lectina ScLL	43
5.2 Ensaio <i>in vitro</i>	43
5.2.1 Atividade citotóxica das lectinas ScLL ou Artin M.....	43
5.2.2 Determinação da produção de citocinas e nitrito em sobrenadantes de macrófagos murinos após a estimulação com diferentes concentrações de ScLL ou Artin M.....	45
5.3 Ensaio <i>in vivo</i>	47
5.3.1 Avaliação da letalidade da lectina ScLL	47
5.3.2 Avaliação da mortalidade dos animais C57BL/6 infectados com <i>T. gondii</i> e tratados com ScLL, Artin M, ScLL e Artin M ou sulfadiazina	48
5.3.3 Efeito imunomodulador das lectinas ScLL e Artin M no controle da infecção por <i>T. gondii</i> <i>in vivo</i>	49
5.3.4 Análise do parasitismo por PCR quantitativa	52
6 Discussão	53
7 Conclusões.....	60
Referências	62
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética	70

RESUMO

As lectinas ScLL e Artin M extraídas, respectivamente, do látex de *Synadenium carinatum* e da semente de *Artocarpus heterophyllus* têm um importante papel na modulação da resposta imune contra patógenos. Ainda não relatos na literatura focando no papel destas lectinas no tratamento da toxoplasmose, doença causada pelo *Toxoplasma gondii*, que representa um sério problema de saúde pública. Portanto, o presente estudo objetiva avaliar o efeito imunomodulatório destas lectinas no controle da infecção pelo *T. gondii*. Primeiro nós avaliamos a citotoxicidade de diferentes concentrações destas lectinas em macrófagos derivado de medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6. Após, investigamos a produção de citocinas e óxido nítrico (NO) em BMDMs com estímulo em diferentes concentrações de lectinas. Nossos resultados demonstram que quantidades maiores do que 1.8 µg de ScLL foram tóxicas para os macrófagos, ao passo que a Artin M, nas concentrações testadas, não apresentaram efeito citotóxico. Além disso, ScLL induziu maiores níveis de IL-12, enquanto Artin M induziu maior produção tanto de IL-12 como de IL-10. Ambas as lectinas foram capazes de induzir o aumento nos níveis de NO. Também avaliamos o efeito da ScLL e Artin M no controle da infecção causada por de *T. gondii* cepa ME-49 em camundongos C57BL/6. Os animais foram infectados e tratados com as lectinas ScLL e/ou ArtinM ou sulfadiazina, e foram avaliados a produção de citocinas, carga parasitária cerebral e mortalidade. Nosso resultados demonstram que ScLL e Artin M também foram capazes de induzir aumento nos níveis de citocinas *in vivo*. Além disso, a carga parasitária foi menor nos animais tratados com as lectinas ScLL e/ou Artin M quando comparado aos animais não tratados. Também foi encontrada uma taxa de sobrevivência maior nos animais tratados com ScLL em comparação aos não tratados. Em síntese, os dados do presente estudo sugerem que os mecanismos imunomoduladores mediados pelas lectinas ScLL e Artin M podem contribuir para o controle da infecção pelo *T. gondii*.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Lectinas. ScLL. Artin M.

ABSTRACT

ScLL and Artin M are lectins from the *Synadenium carinatum* latex and *Artocarpus heterophyllus* seeds that have important role in modulation of immune responses to pathogens. Considering that there are no reports in the literature focusing in the role of these lectins for toxoplasmosis treatment and that this protozoan disease is a serious health public problem caused by *Toxoplasma gondii*, the aim of this study was to evaluate the immunomodulatory effect of ScLL and Artin M in treatment of toxoplasmosis. First, we performed a cytotoxicity assays in bone marrow-derived macrophages (BMDMs) from C57BL/6 mice with different lectin concentrations. After, we investigated the *in vitro* cytokine and nitric oxide (NO) production by macrophages derived from BMDM cells, when stimulated with different lectin concentrations. We found that amounts higher than 1.8 µg of ScLL were cytotoxic for host cells, whereas Artin M had no cytotoxic effect. Also, ScLL presented high capacity to induce pro-inflammatory cytokine in macrophages, such IL-12, while Artin M had high potential to induce both pro and anti-inflammatory profile, by IL-10 and IL-12 production. Further, both lectins were able to increase macrophages NO levels. Hence, we evaluated the treatment effect of ScLL and Artin M in C57BL/6 mice infected by ME-49 strain of *T. gondii*. The animals were infected and treated with ScLL, Artin M, Artin M plus ScLL or sulfadiazine, and analyzed for cytokine production, brain parasite burden and mortality. Our results demonstrated that ScLL and Artin M were able to increase cytokines levels also in *in vivo* model, presenting stronger immunostimulatory effect. In addition, parasite burden was lower on mice treated with ScLL or Artin M plus ScLL. Also we found a higher survival rate in animals treated with ScLL compared to untreated. Overall, our findings suggests that the immunomodulatory mechanisms mediated by lectins ScLL and Artin M can contribute to the control of *T. gondii* infection.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Lectins. ScLL. Artin M.

1 Introdução

Toxoplasmose é a infecção causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, sendo uma das zoonoses parasitárias mais comuns no mundo. Sua capacidade de distribuição e seu grau de adaptação fazem do *T. gondii* um dos parasitos mais bem sucedidos na relação parasito-hospedeiro. O sucesso do parasito pode ser evidenciado pelo alto índice de infecção e acredita-se que atualmente cerca de 1/3 da população mundial adulta seja infectada pelo *T. gondii*.

Embora a toxoplasmose seja assintomática para a maioria dos indivíduos saudáveis, sem causar nenhuma alteração clínica evidente ao longo de toda a vida, ela possui sérios efeitos sobre uma parcela da população.

Pacientes imunodeprimidos e recém-nascidos são seriamente acometidos pela doença, podendo apresentar quadros graves com desenvolvimento de sequelas irreversíveis ou até mesmo a morte. O aumento do número de indivíduos imunodeprimidos, devido ao advento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a gravidade do quadro em neonatos e alta taxa de distribuição na população fazem da toxoplasmose um sério problema de saúde pública.

Até o momento, o único método de tratamento eficaz para toxoplasmose é a administração de uma combinação de fármacos, entre eles, a sulfadiazina, no entanto, o tratamento preconizado não é capaz de curar o indivíduo acometido pela doença e causa uma série de efeitos colaterais, como alterações hematológicas, além do potencial teratogênico dos fármacos utilizados.

Portanto, são necessários estudos na tentativa de buscar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que possam ser uma alternativa ao tratamento padrão da toxoplasmose.

A utilização de lectinas como ferramentas no combate a infecções parasitárias vem sendo estudada em diferentes modelos devido à capacidade dessas glicoproteínas em ativar mecanismos efetores da resposta imune. Lectinas já foram estudadas como adjuvantes em modelos de infecção por *Neospora caninum*, *Leishmania amazonensis* e no combate a infecção por fungos *Paracoccidioides brasiliensis*.

Contudo, ainda não se tem registro de estudos de lectinas como mecanismo de controle à infecção pelo *T. gondii*. Sendo assim este estudo propôs investigar o potencial de duas lectinas específicas no controle da infecção pelo *T. gondii* por meio da capacidade imunomoduladora que estas moléculas exercem no sistema imune.

2 Referencial Teórico

2.1 *Toxoplasma gondii*

2.1.1 Parasito

Toxoplasma gondii, agente etiológico da toxoplasmose, é um protozoário intracelular obrigatório que pode invadir e se multiplicar em células nucleadas do hospedeiro. Tal parasito é identificado por sua morfologia apical única, onde estão localizadas organelas específicas como roptrias e micronemas (DE SOUZA, 1974).

T. gondii foi primeiramente identificado em 1908 e 1909 em uma espécie de roedor (*Ctenodactylus gundi*) típico da região norte africana, por pesquisadores do Instituto Pasteur da Tunísia, ao analisarem células do fígado e baço do animal (NICOLLE; MANCEAUX, 1908). Concomitantemente no Brasil, Afonso Splendori realizava estudo no qual observou e isolou o *T.gondii* de coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) (DUBEY, 2008).

Pesquisadores brasileiros também participaram dos estudos iniciais com *T.gondii*, no possível primeiro caso de toxoplasmose congênita relatado. Já em 1927, Carlos Bastos Magarinos Torres observou lesões como meningoencefalomielite e parasitos no Sistema Nervoso Central de um recém-nascido autopsiado, sugerindo neurotoxoplasmose (TORRES, 1927).

Com relação a sua taxonomia, *T. gondii* pertence ao Reino Protista, Filo Apicomplexa, Ordem Eucoccidiida, Subordem Eimeriina, Família Sarcocystidae, Subfamília Toxoplasmatinae, Gênero *Toxoplasma*, e Espécie *Toxoplasma gondii* (NEVES, 2011).

No filo apicomplexa também estão inseridos outros parasitos de grande relevância à saúde pública como, os do gênero *Plasmodium* responsável pela malária, *Eimeria* causador da coccidiose, tanto em mamíferos quanto em aves e o *Cryptosporidium* responsável pela criptosporidíase que assim como a toxoplasmose possui grande relevância em indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (DUBEY, 1993).

Tem sido recentemente republicado que *T. gondii* pode infectar tanto mamíferos quanto aves, sendo parasito de enorme versatilidade e distribuição mundial (YAROVINSKY, 2014). Nos humanos a principal forma de infecção ocorre por alimento contaminado, carne crua ou mal passada contendo cistos ou por contato indireto com fezes de gatos contendo oocistos, além da transmissão transplacentária. O parasito é bem tolerado pela grande maioria da

população, porém indivíduos imunodeprimidos, como pacientes com AIDS sofrem os efeitos mais danosos da infecção pelo *T. gondii* (YAROVINSKY, 2014).

2.1.2 Morfologia e organização estrutural

A palavra toxoplasma que dá nome ao gênero da espécie, remete a morfologia do parasito, *toxon* (arco) e *plasma* (molde) ambas derivadas do grego.

Como célula eucariota, *T. gondii* possui núcleo organizado, retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi, mitocôndria e grânulos densos, além de organelas especializadas, como micronemas que participam da migração do parasito entre as células, possibilitando a invasão e replicação do *T. gondii* no tecido do hospedeiro (CARRUTHERS, V. B.; TOMLEY, 2008).

No envoltório do parasito são distinguidos três tipos de membranas, uma membrana externa ou membrana plasmática e duas membranas internas. A primeira é contínua, responsável por proteger e manter a osmolaridade do parasito, e as segundas são porosas (possuem microporos) permitindo o tráfego de nutrientes oriundos da célula hospedeira (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

Sendo apicomplexa, *T. gondii* apresenta complexo apical, esta estrutura está localizada na extremidade anterior do parasito, sendo formada pelo conóide (apicomplexas cocídeos), anéis apicais, anéis polares e microtúbulos subpeliculares (DUBEY et al., 1998).

Além dos elementos do citoesqueleto acima citados, o complexo apical apresenta conjunto de organelas secretoras formado por micronemas, roptrias e grânulos densos que conferem ao parasito, capacidade de adesão e invasão às células do hospedeiro (CARRUTHERS, V. B., 1999).

As micronemas são organelas que interagem com os componentes da superfície da célula hospedeira, utilizando proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático e glicosilada no complexo de Golgi, que funcionam como adesinas (CARRUTHERS, V. B.; TOMLEY, 2008).

Como bem revisado por SOUZA e colaboradores (2010), as micronemas podem secretar até 11 tipos de proteínas diferentes, designadas de MIC1 a MIC11, cada uma com domínio de ligação específico, podendo ser classificadas em quatro grupos, são eles,

semelhantes á lectinas (MIC3 e MIC8), integrinas (MIC2), trombospondina (MIC1 e MIC2) e tipos Fator de Crescimento Epidermal (EGF) (MIC6, 7, 8 e 9).

As roptrias são organelas fundamentais para a penetração do parasito á célula hospedeira, seu conteúdo proteico é liberado após a secreção de proteínas das micronemas durante a internalização do parasito. Estão localizadas na região anterior ao núcleo do parasito e são delimitadas por membrana (GUBBELS; DURASINGH, 2012).

Assim como as micronemas, roptrias também possuem conteúdo proteico variado, são conhecidas vinte e nove proteínas que foram localizadas no interior da organela, definidas de ROP1 a 29. A secreção de ROP1 (enzima proteolítica) juntamente com ROP2, 3, 4 e 18 ocorre na invasão à célula hospedeira (BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008). Devido ao seu papel chave na infecção do *T. gondii*, as roptrias e seu conteúdo proteico foram associados a fatores de virulência do parasito (BRADLEY; SIBLEY, 2007; HUNTER; SIBLEY, 2012).

Por fim temos o terceiro grupo de organelas secretórias do *T. gondii*, os grânulos densos. Essas organelas estão distribuídas no citoplasma do parasito e ao que tudo indica secretam seu conteúdo proteico posterior à invasão da célula hospedeira (SOUZA et al., 2010).

A secreção do conteúdo proteico dos grânulos densos ocorre no limite do vacúolo parasitóforo, as glicoproteínas secretadas ficam ligadas a sua membrana, sendo responsáveis pela estabilização do vacúolo e contribuindo para evasão do parasito às respostas da célula hospedeira (CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, 2007).

2.1.3 Invasão à célula hospedeira

A principal forma de contato do hospedeiro com o parasito ocorre pela ingestão de alimento (carne) ou água contaminados com, respectivamente, cistos ou oocistos, do *T. gondii*. Após a passagem pelo estômago os cistos ou oocistos são estimulados (pela variação de pH e temperatura) a mudar sua morfologia, se diferenciam em trofozoítos (no caso da ingestão de cistos) ou esporozoítos (no caso da ingestão de oocistos) e infectam a mucosa do intestino delgado (WILHELM; YAROVINSKY, 2014).

Apesar de não ser definido um alvo específico, acredita-se que os enterócitos presentes nas vilosidades intestinais e as células caliciformes sejam a porta de entrada para o parasito (DUBEY et al., 1997).

Toxoplasma gondii penetra na célula hospedeira de forma ativa, ou seja, diferentemente de outros micro-organismos, ele não necessita ser fagocitado ou endocitado por células do hospedeiro (CARRUTHERS, V. B., 2002; SIBLEY, 2010). A capacidade secretória juntamente com mudanças rápidas em seu citoesqueleto permite ao parasito invadir rapidamente a célula hospedeira, levando de 5 a 30 segundos desde o reconhecimento da célula alvo até a penetração total (SIBLEY, 2004).

A grande motilidade do *T. gondii* durante a invasão à célula hospedeira é possível graças a mudanças rápidas em seu citoesqueleto, no chamado “*gliding*” (movimento em espiral ativo) o parasito penetra nas células do hospedeiro (SIBLEY, 2010). O movimento “*gliding*” ocorre com a participação de miosina, como TgMyoA (*Toxoplasma gondii* Miosina A), sendo verificado aumento dos níveis de cálcio intracelular e fosforilação de TgMyoA em uma via cálcio dependente, proporcionando além da invasão, a saída da célula infectada (TANG et al., 2014).

O processo inicial de invasão (reconhecimento, adesão, secreção de proteínas e variação do citoesqueleto) é fundamental para que o parasito tenha êxito nas etapas posteriores da infecção, por isso o mesmo ocorre rapidamente, em poucos segundos (KASPER; MINEO, 1994; MINEO et al., 1993).

2.1.4 Ciclo de biológico e formas evolutivas

O ciclo evolutivo de *T. gondii* é heteroxênico, apresenta reprodução assexuada nos hospedeiros intermediários (aves e mamíferos em geral) e reprodução sexuada em felinos, sendo estes os hospedeiros definitivos (Figura 1). O parasito exibe três formas evolutivas, esporozoítos no interior de oocistos, bradizoítos em cistos teciduais e taquizoítos que se multiplicam assexuadamente no interior de células nucleadas (DUBEY et al., 1998).

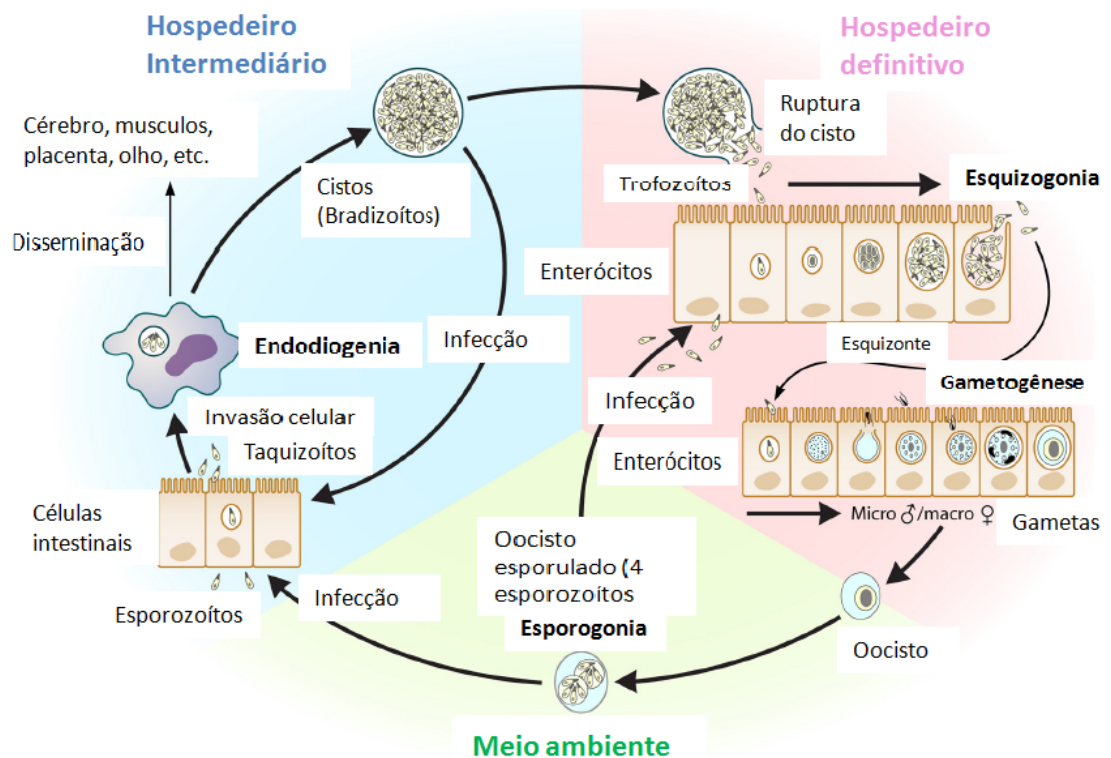
O ciclo assexuado ocorre em diferentes células tanto dos hospedeiros intermediários, quanto nos definitivos (felinos), já a fase sexuada se desenvolve apenas nas células do epitélio intestinal (IECs) dos hospedeiros definitivos (DUBEY, 2004).

Devido à complexidade, o ciclo de vida completo do *T. gondii* só foi totalmente desvendado 60 anos após sua descoberta. Até meados de 1970 a comunidade científica havia definido apenas a fase assexuada do ciclo biológico do parasito (DUBEY, 2009).

Ao final da década de 1960 pesquisadores verificaram que o gato era o elo chave na toxoplasmose, uma vez que eram os hospedeiros definitivos do parasito e disseminavam oocistos pelas fezes (FRENKEL; DUBEY; MILLER, 1970).

O ciclo sexuado se inicia quando o felino (doméstico ou selvagem) ingere carne contendo cistos, no trato digestivo sob a ação de enzimas gástricas, a parede do cisto se rompe e os trofozoítos são liberados, estes por sua vez infectam os enterócitos. A multiplicação inicial é assexuada (esquizogonia) e auto-limitada, dá origem aos merozoítos, segue-se o desenvolvimento dos gametócitos (gametas masculino e feminino), após a fertilização é formado o oocisto que permanecem dentro dos enterócitos, até a excreção nas fezes já em sua forma esporulada (esporozoítos). O ciclo biológico é apresentado abaixo (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

Figura 1 – Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*.



Fonte: adaptado de ROBERT-GANGNEUX; DARDE (2012).

2.1.5 Resposta imune

As interações entre a resposta imune do hospedeiro e o *Toxoplasma gondii* são complexas, envolvem mecanismos imunes inatos e adaptativos de defesa e a modulação dos mesmos pelo parasito. A pressão do sistema imune sobre o parasito leva o estabelecimento do equilíbrio resposta imune/multiplicação do parasito, marcado pela mudança conformacional do parasito em estados lentos de replicação (DUBEY, 1986).

A resposta imune do hospedeiro contra *T.gondii* utiliza mecanismos da imunidade inata e adaptativa. Estudos realizados ao longo das últimas duas décadas concluem que o padrão de resposta adaptativa T auxiliar tipo 1 (Th1), conduzidas por citocinas IFN- γ e IL-12, produzidas pelas células da imunidade inata (macrófagos, células dendríticas e células NK) é essencial no controle da infecção (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

Após a ingestão de cistos ou oocistos, contendo, respectivamente, bradzoítos ou esporozoítos, estes invadem as células epiteliais do intestino delgado, se diferenciam em taquizoítos que multiplicam rapidamente invadindo qualquer célula nucleada, incluindo fagócitos profissionais. Nesse estágio inicial ocorrem as primeiras interações e modulação da resposta imune do hospedeiro pelo parasito (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

Células da imunidade inata detectam *T. gondii* diretamente pelo reconhecimento de moléculas específicas do parasito por receptores semelhantes à *Toll* (TLRs) e por danos teciduais causados nas etapas iniciais da infecção. Esses receptores estão distribuídos na superfície das células ou em seu interior, como TLR4 e TLR2 de endossomos, envolvidos no processo de reconhecimento da molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) do parasito. Tanto receptores de membrana quanto citoplasmáticos utilizam a via de sinalização MYD88 para ativação do fator 8 regulador de Interferon (IRF8) e Fator de Transcrição NF-KB, resultando na produção das citocinas IFN- α IL-12 e respectivamente (YAROVINSKY, 2014).

Citocinas IL-12, IFN- γ e IFN- α são mediadores solúveis que modulam a resposta imune, atuam de forma sinérgica para controlar a infecção pelo *T. gondii*, regulando processos inflamatórios que controlam o crescimento parasitário. IL-12 precede à liberação de IFN- γ por linfócitos T, que por sua vez inibem a proliferação do parasito (SCHARTON-KERSTEN et al., 1996).

A citocina IL-12 possui grande importância no combate ao *T. gondii*, é produzida por macrófagos, células dendríticas (sobretudo pelas do subtipo CD8 α^+) neutrófilos e monócitos

inflamatórios. IL-12 é um heterodímero, torna-se ativa quando a subunidade p40 se liga covalentemente à subunidade p35, Camundongos deficientes em sua produção são drasticamente mais sensíveis à infecção pelo *T. gondii* (SANECKA; FRICKEL, 2012).

IL-12 produzida por macrófagos e demais células da imunidade inata, na presença do *T. gondii* estimulam a proliferação de células TCD4⁺ que conduz ao padrão de resposta Th1 e secreção de IFN- γ (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). Além de IL-12, macrófagos ativados produzem ROI (Intermediários Reativos de Oxigênio) e NO (Óxido Nítrico), estas moléculas participam do processo de apresentação de antígeno aos linfócitos e exercem ação citotóxica diretamente ao parasito (DUNAY; SIBLEY, 2010).

Outro mecanismo utilizado pelo sistema imune na resposta à infecção pelo *T. gondii* é a produção de óxido nítrico (NO) por células de defesa. Após estudos iniciais, foram estabelecidas as funções do NO não apenas sobre o endotélio vascular e em processos inflamatórios, mas também nos imunopatológicos. Na década de 90 pesquisadores comprovaram a participação do NO de macrófagos, formado na presença de iNOS na defesa contra patógenos intracelulares, incluindo o *T. gondii* (KHAN et al., 1997).

Células da imunidade inata, como macrófagos, utilizam NO para combater infecções. Segundo WOODS et al. (2013), o NO é produzido com auxílio de enzimas específicas como iNOS que atuam em conjunto com outras enzimas produtoras de formas reativas de oxigênio para reduzir a multiplicação do *T. gondii*.

A utilização do NO na defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *T. gondii* também está presente em células dendríticas e células *Natural Killers* (NK). Por meio da ação do NO ocorre redução da replicação do *T. gondii* devido à redução da oferta de arginina, uma vez que este é um aminoácido essencial para o crescimento do parasito (YAROVINSKY, 2014).

A relação entre os mecanismos efetores de defesa das células do hospedeiro via NO e parasitos está em constante evolução, atualmente sabe-se que o *T. gondii* é capaz de inibir a produção de NO em macrófagos pela degradação de iNOS (SEABRA; DE SOUZA; DAMATTA, 2002).

Em estudo realizado em macrófagos de linhagem (J774-A1), concluíram que a degradação da enzima iNOS, após a infecção pelo *T. gondii* envolve a via proteolítica da ubiquitina-proteassoma, acarretando em menor quantidade de NO para o combate ao parasito (PADRAO JDA et al., 2014).

2.1.6 Doença, Aspectos Clínicos e Epidemiologia

A doença causada pelo *T. gondii* é denominada toxoplasmose, classificada como zoonose de distribuição cosmopolita. Sua manifestação clínica apresenta espectro variado, desde infecção assintomática a quadros mais abrangentes e graves. Na prática, a doença pode ser distinta de acordo com a manifestação clínica e/ou população afetada em: toxoplasmose febril aguda, linfadenite toxoplásmica, toxoplasmose ocular, neonatal, em pacientes imunodeprimidos e na gravidez (BRASIL, 2010).

A fase aguda é na maioria das vezes, em indivíduos imunocompetentes, assintomática, contudo a infecção inicial pode causar febre acompanhada de exantema e outras manifestações sistêmicas. As lesões são decorrentes da rápida proliferação do parasito nas células do hospedeiro, podendo acometer, pulmões (pneumonia difusa), cérebro (encefalite), fígado (hepatite) e coração (miocardite), porém esta fase tem evolução benigna, sendo auto-limitada (BRASIL, 2010).

Na linfadenite toxoplásmica o hospedeiro apresenta linfadenopatia localizada, geralmente envolvendo nódulos linfáticos cervicais ou em casos raros, linfadenopatia generalizada. As alterações linfáticas parecem ser mais comuns em mulheres, o quadro se estende por período de uma semana a um mês, associado à fase febril aguda (BRASIL, 2010).

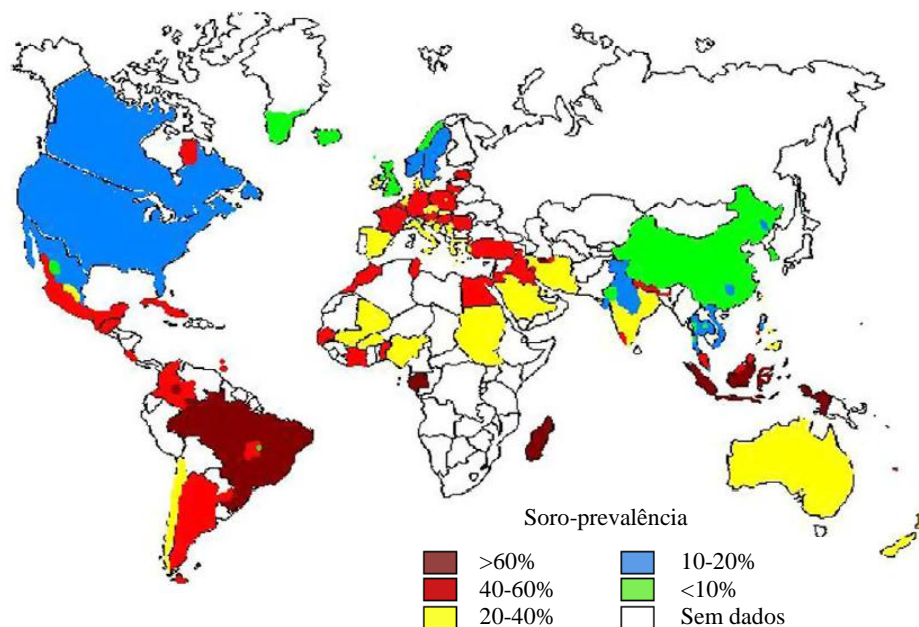
A toxoplasmose ocular é caracterizada por lesão de natureza inflamatória, sendo a principal causa de uveíte posterior e coriorretinite. Em casos mais graves, a toxoplasmose ocular pode evoluir e causar cegueira, nos Estados Unidos cerca de 250 mil atendimentos oftalmológicos são associados à doença (PLEYER; SCHLUTER; MANZ, 2014).

Outra forma clínica da doença é a toxoplasmose congênita, resulta da infecção intra-uterina durante a gestação, as intensidades das lesões variam de acordo com a idade fetal e fatores imunológicos. A principal complicação da toxoplasmose congênita é a coriorretinite e nos recém-nascidos a toxoplasmose é acompanhada de leucocitose com aumento relevante do número de leucócitos e monócitos, estabelecendo relação direta entre a doença e a resposta imune do hospedeiro (MACHADO et al., 2014).

Um grupo seriamente afetado pela toxoplasmose são os pacientes portadores do vírus HIV, que desenvolvem AIDS. Nesses indivíduos devido ao comprometimento da resposta imune, ocorre o desenvolvimento de quadro clínico grave, como encefalite (LUFT et al., 1984).

Analisando sua distribuição epidemiológica, *T. gondii* se destaca como um dos protozoários de maior sucesso na relação de parasitismo com seus hospedeiros, capaz de infectar a maioria dos vertebrados homeotérmicos (DUBEY, 1998). *Toxoplasma gondii* pode ser definido como o mais bem sucedido protozoário parasito intracelular obrigatório (DUBEY, 1998; SIBLEY, 2003). Segundo dados mais recentes os índices de soroprevalência são elevados em diversas regiões do globo como América do Sul, Europa e Oceania (Figura 2).

Figura 2 – Índice de distribuição mundial do *Toxoplasma gondii*.



Fonte: Adaptado de Andrews, Fisher e Skinner-Adams (2014)

De acordo com o Centro de Controle de Doenças (CDC, do inglês, *Centers for Disease Control*) em alguns lugares do mundo o índice de infecção pelo *T. gondii* chega a ser de 95%, nos Estados Unidos estima-se que 22,5% da população esteja infectada. No Brasil também há ampla distribuição do parasito, cuja prevalência da infecção chega a ser de 50% em crianças e 80% em mulheres com idade fértil (DUBEY et al., 2012).

Um dos fatores responsáveis pelos elevados índices de transmissão da toxoplasmose ao homem é a enorme quantidade de felinos infectados com *T. gondii*. Estima-se que

praticamente 100% dos felinos selvagens e de 30 a 40% dos domésticos sejam infectados pelo parasito (SCHLUTER et al., 2014).

Cada felino infectado elimina milhares de oocistos ao longo da vida, os oocistos são adaptados para permanecerem viáveis por longo período de tempo no meio ambiente, assim o *T. gondii* se dissemina (solo, água, pastagens) e infecta ruminantes, ovinos, suínos e aves, que são fonte de alimento ao homem. Portanto, a relação entre o homem e animais infectados contribui para os elevados índices epidemiológicos da toxoplasmose (SCHLUTER et al., 2014).

2.1.7 Tratamento

No Brasil, o Ministério da Saúde estabelece que o tratamento específico para toxoplasmose nem sempre é indicado a indivíduos imunocompetentes, uma vez que a doença possui curso benigno e é bem tolerada nesse grupo. Deve ser avaliada a possibilidade de infecção pelo HIV em indivíduos imunocompetentes com sintomas clínicos e sorologia positiva para toxoplasmose (Brasil, 2010).

O tratamento tradicional é preconizado para gestantes, recém-nascidos e pacientes imunodeprimidos, segue o esquema terapêutico descrito a seguir (Tabela 1). Gestantes seguem normas específicas de tratamento, deve ser prescrito espiramicina, 750 a 1000 mg, via oral (VO), a cada 8 horas, ou clindamicina VO, na dose de 600 mg a cada 6 horas. Nos casos de toxoplasmose ocular, a fim de reduzir o processo inflamatório, necrose e minimizar a cicatriz ocular, deve ser administrado prednisona na dose de 40 mg/dia VO, por uma semana e 20 mg/dia por outras sete semanas. O fármaco pirimetamina é contraindicado no 1º trimestre de gravidez, devido sua ação teratogênica, e a Sulfadiazina no 3º trimestre pelo risco de kernicterus (BRASIL, 2010).

Tabela 1 – Esquema terapêutico preconizado pelo Ministério da Saúde à pacientes gestantes, recém-nascidos e imunodeprimidos

Adultos			
Nos 3 primeiros dias de tratamento		No 4 ^o dia em diante	Tempo de tratamento
Pirimetamina Sulfadiazina	2mg/Kg 25mg/Kg/dia 4x/dia	1mg/dia 25mg/Kg/dia 4x/dia	4 a 6 Semanas
Ácido fólinico	5 a 10mg/dia	5 a 10mg/dia	
Criança			
Pirimetamina Sulfadiazina	2mg/Kg 25mg/Kg/dia 4x/dia	1mg/dia 25mg/Kg/dia 4x/dia	4 Semanas
Ácido fólinico	1mg	1mg	

Fonte: Brasil (2010).

Os fármacos utilizados possuem estrutura molecular e funções antiparasitárias específicas. Pirimetamina atua como inibidor seletivo da síntese de ácido fólico em taquizoítos do *T. gondii* e na inibição da síntese de ácidos nucleicos. Sua ação é efetiva quando combinada com outras drogas antiparasitárias, contudo deve ser usada com cautela devida sua toxicidade, uma vez que interage com processos bioquímicos do hospedeiro. Soma-se a isto sua ação tóxica sobre a medula óssea, podendo causar trombocitopenia, anemia megaloblástica e leucopenia. Para prevenção as agressões á medula óssea a pirimetamina deve ser administrada juntamente com ácido folínico (CHENE; THIEBAUT, 2009).

Outra classe de fármacos utilizadas no tratamento da toxoplasmose são as sulfonamidas, como a sulfadiazina que possui ação parasitostática, por inibir a síntese de folatos. Após sua administração por via oral as sulfonamidas são absorvidas no tracto digestivo e se distribuem por todos os tecidos e líquidos corporais. Sulfonamidas são efetivas apenas sobre taquizoítos do parasito, sua atividade ocorre pela droga ser análoga estruturalmente ao PABA (Ácido p-aminobenzóico), onde por meio de competição (pelo mesmo sítio de ligação) impedem a incorporação do PABA na biossíntese do ácido diidropteróico, culminando na ação antimetabólito (BOSCH-DRIESSEN et al., 2002).

Atualmente novos desafios surgiram no tratamento da doença, assim como outras infecções parasitárias, na toxoplasmose também ocorre o fenômeno da resistência às drogas

disponíveis. É cada vez maior a necessidade de descoberta e o estabelecimento de novos esquemas terapêuticos (ANDREWS et al., 2014).

Nesse sentido, o presente trabalho visa estudar os efeitos de lectinas isoladas de plantas no tratamento à toxoplasmose, utilizando um modelo experimental *in vitro* e *in vivo* de camundongos infectados com *T. gondii*.

2.2 Lectinas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas com a capacidade de interagir com moléculas de carboidratos, também chamadas de hemaglutininas, devido a sua capacidade de aglutinar eritrócitos. Os primeiros estudos envolvendo lectinas são datados de 1888, desenvolvido por Peter Hermann Stillmark que trabalhando com sementes de mamona (*Ricius communis*) conseguiu isolar a molécula proteica denominada ricina, potencialmente tóxica, posteriormente identificada como lectina (VAN DAMME, 2014).

Após observações iniciais, Ehrlich em 1891 verificou que a ricina era capaz não apenas de aglutinar hemácias, mas também precipitar diversas proteínas do soro. Os estudos com ricina possibilitaram o entendimento de processos imunes, como transmissão da capacidade protetora ao longo das gerações, quando o gado era estimulado pela ingestão de pequenas quantidades de ricina e adquiria resistência à intoxicação por *Ricius communis* (VAN DAMME, 2014).

Lectinas apresentam distribuição universal na natureza, ou seja, são produzidas e encontradas em uma extensa variedade de seres vivos como, bactérias, fungos, plantas, insetos, crustáceos, mamíferos e até mesmo em vírus (INGALE; HIVRALE, 2013).

Os estudos a respeito de lectinas, suas estruturas e funções, focaram em sua grande maioria nas lectinas de origem vegetal, desenvolvendo praticamente um novo ramo da ciência conhecido como “lectinologia”. Ao longo da década de 1970 a lectinologia se desenvolveu e pesquisadores conseguiram isolar a primeira lectina de origem animal, denominada lectina hepática de mamíferos (STOCKERT; MORELL; SCHEINBERG, 1974).

O conhecimento acumulado ao longo dos anos possibilitou maior compreensão dos eventos biológicos envolvendo lectinas, Atualmente sabe-se que o processo de

reconhecimento proteína-carboidrato é fundamental para a ativação, migração e adesão de diferentes tipos celulares. Lectinas interagem com carboidratos por domínio específico de ligação denominado CRD (*Carbohydrate Recognition Domain*), cada lectina possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga de forma específica e reversível a monossacarídeos, oligossacarídeos e glicoconjugados (DIAS et al., 2015).

Em animais e micro-organismos as lectinas atuam como mediadores biológicos de eventos relacionados ao reconhecimento celular, nas plantas são relevantes nos processos de defesa contra patógenos além de funções fisiológicas (CAVADA et al., 2001).

Plantas assim como animais estão constantemente sujeitas a invasão de agentes patogênicos, lectinas são parte do sistema imune vegetal e foram isoladas de diferentes compartimentos como, raízes, sementes, casca, flores, tubérculos, folhas, látex, seiva e ovários (DIAS et al., 2015). A maioria dos estudos de caracterização e isolamento de lectinas é referentes às famílias Leguminosae, Euphorbiaceae e Moraceae (KABIR, 1998).

Lectinas de plantas são um grupo importante de substancias bioativas estudada desde a década de 60 como ferramentas de defesa devido a sua interação com receptores que possuem porção de glicanos, localizados na superfície de células de defesa. A ativação desses receptores via lectinas produzem eventos bioquímicos em cascata com consequente produção de citocinas (SOUZA et al., 2013).

As lectinas estabelecem relação estreita com as células do sistema imune, atuam como receptores de reconhecimento de PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos), incluindo lectinas solúveis, como colectinas (nas quais encontramos as lectinas ligantes de manose, MBLs), ficolinas e pentraxantinas (como as proteínas C-reativas) e lectinas integrais (lectinas do tipo C exercem a função de receptores de membrana em macrófagos reconhecendo porções de manose) (VASTA, 2009).

Aplicações práticas para as lectinas vegetais foram verificadas graças ao seu potencial imunoestimulador, estudos comprovaram a alta especificidade das lectinas por açúcares e seu potencial ativador das respostas imunes na ativação de macrófagos com produção de IL-12 e neutrófilos (PANUNTO-CASTELO et al., 2001) (TOLEDO et al., 2009).

Entre as aplicações já estudadas com lectinas estão, tratamento de câncer, proliferação de linfócitos humanos (atividade mitogênica), potencial fungicida e como possível ferramenta para inibição do crescimento de bactérias e vírus (INGALE; HIVRALE, 2013).

As aplicações de lectinas como ferramentas biológicas contra patógenos que infectam o homem é atualmente uma das fronteiras do conhecimento na medida em que cada vez mais estudos promissores são publicados (DIAS et al., 2015).

2.2.1 Lectina do látex de *Synadenium carinatum* (ScLL)

Entre as lectinas extraídas de plantas estudadas como substâncias imunomoduladoras, temos a lectina (ScLL) extraída e purificada do látex da Euphorbiaceae *Synadenium carinatum*. Conhecida como “leiterinha santa” *S. carinatum* foi primeiramente cultivada no Brasil como planta ornamental, posteriormente seu látex passou ser utilizado na medicina popular no tratamento de várias doenças (Souza et al., 2005).

Acreditando no potencial imunoestimulador e adjuvante da ScLL Afonso-Cardoso (2007) estudou o efeito dessa lectina em modelo de vacinação contra leishmaniose cutânea, concluindo que a ScLL associada ou não ao antígeno solúvel de *Leishmania amazonensis* na imunização de camundongos induziu uma potente resposta Th1 e secreção das citocinas IL-12 e IFN γ além de garantir efeito protetor aos animais reduzindo a taxa de infecção após o desafio com *L. amazonensis*.

ScLL também foi utilizada em modelo *in vitro* de leishmaniose, onde macrófagos murinos peritoneais foram pré-tratados e posteriormente infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os resultados mostraram que a lectina foi capaz de ativar os macrófagos, estimular a produção de citocinas IL-12, IL-1 e TNF- α e reduzindo crescimento de amastigotas no interior das células (AFONSO-CARDOSO et al., 2011).

Após a caracterização por Souza e colaboradores (2005) e os estudos iniciais com *L. amazonensis*, pesquisadores também avaliaram o potencial adjuvante da ScLL na vacinação contra neosporose em modelo murino (CARDOSO et al., 2012)

2.2.2 Lectina da semente de *Artocarpus heterophyllus* (Artin M)

Artin M é uma lectina extraída das sementes do fruto da planta de origem indiana conhecida como Jaca (*Artocarpus integrifolia*). Os primeiros estudos descrevendo lectinas nas

sementes de *Artocarpus integrifolia* foram desenvolvidos em 1979, onde pesquisadores observaram a forte capacidade hemaglutinante e a presença de glicoproteínas na estrutura da “lectina da Jaca” (CHATTERJEE et al., 1979).

A lectina isolada das sementes do fruto da Jaca, foi primeiramente denominada jacalina, rapidamente se tornou ferramenta em estudos de imunomodulação. Devido à presença de mais de uma lectina isoladas a partir de *A. integrifolia*, surge o termo Lectinas Relacionada à Jacalina (JRL) utilizado para denominação do conjunto de lectinas, com afinidades por carboidratos diferentes (PEREIRA-DA-SILVA; ROQUE-BARREIRA; VAN DAMME, 2008).

Artin M, primeiramente denominada KM+ ou Artocarpina, possui afinidade específica por monossacarídeos α -D-manose, α -D-glucose e α -metil manoside, a modificação na nomenclatura levou em consideração sua especificidade, como lectina ligante de manose, e tem o objetivo de facilitar a comunicação e evitar confusão em publicações que utilizam a lectinas derivadas de *Artocarpus integrifolia* (PEREIRA-DA-SILVA et al., 2008).

Assim como outras lectinas, Artin M é capaz de modular a resposta imune, ativando células de defesa como neutrófilos, podendo ser utilizada como possível ferramenta no tratamento de infecções (TOLEDO et al., 2009).

Artin M interfere em diferentes mecanismos da resposta imune ela é capaz de ativar macrófagos a liberarem IL-12, que por sua vez estimulam linfócitos a produzirem IFN- γ modulando, portanto, tanto a resposta imune inata e quanto adaptativa (PANUNTO-CASTELO et al., 2001).

Estudos mais recentes revelam o potencial de Artin M como agente cicatrizante em tecido de mucosa oral, pela indução de TGF- β (Fator de Transformação do Crescimento) e liberação de VEGF (Fator de Crescimento Vascular Endotelial), aumentando a proliferação celular. Evidenciando mais uma vez o potencial de lectinas como ferramentas biomoduladoras (KIM et al., 2013).



3 Objetivos

3.1 Geral

Avaliar o efeito e o potencial imunoestimulador das lectinas de *Synadenium carinatum* (ScLL) e *Artocarpus integrifolia* (Artin M) no controle da toxoplasmose.

3.2 Específicos

- Analisar o efeito *in vitro* das lectinas ScLL e Artin M na produção de citocinas por macrófagos primários derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6.
- Analisar o efeito *in vivo* das lectinas ScLL e Artin M em camundongos C57BL/6 infectados com cistos de *Toxoplasma gondii* cepa ME-49 através mensuração da carga parasitária cerebral e curva de mortalidade.
- Analisar o efeito na produção de citocinas em modelo *in vivo* de camundongos C57BL/6 infectados com cistos de *Toxoplasma gondii* cepa ME-49, tratados com lectinas ScLL e/ou Artin M.

4 Material e Métodos

4.1 Extração das Lectinas ScLL e Artin M

A lectina de *Synadenium carinatum* (ScLL) foi obtida a partir do extrato aquoso do látex da planta como descrito por Souza e colaboradores (2005), com algumas modificações. O látex extraído da planta foi homogeneizado com água destilada (1:10) a 4°C por 24 horas, centrifugado (3.500 x g, 30 minutos, 4°C) (centrífuga de eppendorf) e filtrado em membrana clarificante (0,45 µm; Merck, Göttingen, Alemanha), originando o extrato aquoso total. Este extrato foi congelado a - 20°C por 48 horas. Após o descongelamento o extrato foi novamente filtrado em membrana clarificante (0,45 µm; Merck, Göttingen, Alemanha). O extrato filtrado foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de D-galactose imobilizada em agarose (Pierce, Rockford, IL, EUA) e a fração ligante foi eluída com D-galactose (Sigma Chemical Co.) a 0,2M em solução salina tamponada com Borato (BBS) a 5 mM (pH 8,0) e, em seguida, concentrada e dialisada em sistema Amicon® (Merck, Göttingen, Alemanha) com membrana de separação proteica *cut off* de 40kDa. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As alíquotas das lectinas foram armazenadas a - 20°C até a data de sua utilização nos experimentos.

A lectina de *A. integrifolia* (Artin M) foi enviada purificada para realização dos ensaios pela Dra. Maria Cristina Roque-Barreira do Laboratório de Glicobiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. A preparação do extrato total de sementes de *Artocarpus integrifolia* e a obtenção da lectina ligante de manose Artin M são descritos no estudo realizado por (BUNN-MORENO; CAMPOS-NETO (1981); ROQUE-BARREIRA et al., 1986).

4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para confirmar se as alterações feitas no protocolo original de extração da lectina ScLL, não comprometeriam o processo de purificação, realizamos análise do material processado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, em presença de dodecil sulfato de sódio sob condições redutoras (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970).

Amostras de ScLL foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, SDS a 4%, azul de bromofenol a 0,2%, glicerol a 20%) e incubadas por 5 minutos a 100 °C para análise por SDS-PAGE, utilizando sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Hoefer

Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA). Um volume de 15 µl de cada amostra (aproximadamente 20 µg de proteína total) foi aplicado em paralelo aos padrões de peso molecular (Sigma Marker, Sigma Chemical Co.; Bench MarkTM Protein Ladder, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Após a separação eletroforética, o gel foi corado por *Coomassie blue* ou *Coomassie blue* coloidal (G250; Sigma Chemical Co.).

4.3 Ensaios *in vitro*

Após a obtenção das lectinas realizamos ensaios *in vitro* para verificar seu efeito citotóxico e sua capacidade imunomodulatória em célula do sistema imune. Para tanto, utilizamos macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6.

4.3.1 Obtenção de Macrófagos

Para obtenção de macrófagos utilizamos protocolo previamente estabelecido (MARIM et al., 2010).

Camundongos C57BL/6 (n=2) de 6 a 12 semanas de idade foram eutanasiados. Após a eutanásia tiveram seus membros inferiores pulverizados com álcool 70% e feita remoção e dissecação dos fêmures. Com fêmur removido foi realizado corte na articulação fêmoro-tibial e coxo-femoral, cada epífise foi retirada e transferida a tubos de 15 ml com meio RPMI 1640 incompleto. Em câmara de fluxo laminar, os ossos foram colocados em álcool 70% por 1 minuto e as epífises foram cortadas com o auxílio de tesoura e pinça estéreis. Toda técnica e manuseio do material foram realizados de forma asséptica. Os ossos foram lavados com o auxílio de uma seringa contendo meio RPMI 1640 incompleto com agulha de 26G de diâmetro.

A suspensão celular obtida foi centrifugada e ressuspendida em meio RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina, 100mg/ml de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 30% de meio condicionado de células L929, LCCM .

A suspensão celular foi distribuída igualmente em placas de Petri (9 ml/placa) e incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após 96 horas de incubação, foi procedida a troca do meio, adicionando novamente 9 ml/por placa de meio suplementado (conforme descrito no

parágrafo anterior) e incubado por mais 72 horas (sob as mesmas condições iniciais). Ao término do período de incubação, o sobrenadante das placas de Petri foi descartado e realizado o descolamento dos macrófagos com 10 mL de PBS estéril gelado por poço.

Por fim, as células foram centrifugadas a 500 x g por 10 minutos, o pellet obtido foi ressuspendido em RPMI 1640 suplementado com 2% de soro fetal bovino. A contagem global das células foi efetuada em câmara de Neubauer, partindo-se da suspensão de 1 ml diluída 10 vezes em solução de Azul de Trypan para avaliação da viabilidade celular e contagem do número total de macrófagos.

As células então foram utilizadas nos procedimentos experimentais que se seguem.

4.3.2 Teste de Citotoxicidade

Para verificar o efeito citotóxico das lectinas ScLL e Artin M foi realizado ensaio colorimétrico de MTT (MOSMANN, 1983) em macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs). Este método colorimétrico é baseado na capacidade da enzima desidrogenase mitocondrial das células vivas reduzirem o sal MTT (3- (4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo) no produto colorido denominado formazana.

Brevemente, os macrófagos foram aplicados em placa de 96 poços na proporção de 3×10^4 células/poço/200 µl. As células então foram incubadas em quadruplicada com ScLL (50µg, 16,6 µg, 5,5 µg, 1,8 µg, 0,61 µg, 0,20 µg e 0,06 µg. *A quantidade de ScLL refere-se a massa de lectina aplicada por poço.), Artin M (1µg/poço, 0,33 µg/poço, 0,11µg, 0,037 µg, 0,012 µg, 0,004 µg, 0,00013 µg, 0,00004 µg. *A quantidade de Artin M refere-se a massa de lectina aplicada por poço) e meio RPMI e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 48 horas. Ao término desse período, foram retirados o sobrenadante da placa e as células lavadas com 10 µl de reagente MTT (Sigma) a 5mg/ml em 90 µl de meio com SFB 10% por 4 horas. O sal de tetrazólio (MTT) foi então reduzido pela atividade metabólica das células vivas formando cristais de formazana, de cor azul que por sua vez foram solubilizados com SDS (Dodecíl Sulfato de Sódio) 10% (Sigma) e 50% de N,N Dimetilformamida (Sigma). A densidade óptica foi mensurada após 30 minutos em espectrofotômetro a 570nm.

As quantidades iniciais de lectinas utilizadas nesse ensaio foram determinadas com base em estudos anteriores (AFONSO-CARDOSO et al., 2007; CARDOSO et al., 2011).

4.3.3 Determinação da produção de citocinas e nitrito *in vitro*

Os macrófagos murinos (BMDMs) obtidos como anteriormente descrito, foram plaqueados (placa de 96 poços) com suspensão celular (3×10^4 células/200 µl/poço) e estimulados em triplicata com diferentes diluições de ScLL ou Artin M.

As alíquotas de lectinas foram filtradas (membrana de 0,22 µm) e adicionadas à placa nas seguintes concentrações:

ScLL (50 µg/ml, 16,6 µg/ml, 5,5 µg/ml, 1,8 µg/ml, 0,61 µg/ml, 0,20 µg/ml e 0,06 µg/ml) e Artin M (1 µg/ml, 0,33 µg/ml, 0,11 µg/ml). As concentrações de ScLL e Artin M foram estabelecidas com base em observações de estudos anteriores (CARDOSO et al., 2012; PANUNTO-CASTELO et al., 2001). Como controle foram utilizados meio RPMI e LPS (1 µg/ml) de *Escherichia coli* (Lipopolisaccharide B *E.coli* 0111:B4 – Product number L4130 – Sigma., St. Louis, MO, USA) em PBS (tampão fosfato salino). As células foram incubadas com as lectinas e os controles durante 48 horas a 37°C e 5% CO₂.

Para determinação da concentração de IL-10 e IL-12 contidas no sobrenadante, foi realizado Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática (ELISA) de acordo com as recomendações do fabricante (BD Biosciences) como descrito a seguir.

Placas de alta afinidade de 96 poços (Costar/Corning) foram sensibilizadas com anticorpos de captura da respectiva citocina pesquisada e incubadas por 12 horas (*overnight*) à 4°C. Em seguida as placas foram lavadas 3X com PBS-T (PBS-Tween 0,05%) e bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente com PBS + 10% SFB. Após nova lavagem, (3X com PBS-T) foram adicionados 50 µl das curvas de cada citocina (2000pg/ml tanto para IL-12 quanto para IL-10) e 50 µl de cada amostra dos sobrenadantes de macrófago e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, após lavagens (5X com PBS-T) as placas foram incubadas com Detector de Trabalho (anticorpos de detecção + estreptavidina conjugada com peroxidase + diluente) por 1 hora a temperatura ambiente no escuro. Foram então lavadas (6X PBS-T) e adicionados 50 µl por poço de substrato (10mM de tampão citrotofosfato, 0,4 mM de 3,3',5,5'- Tetrametilbenzidina (TMB) (SIGMA) e 1,2 mM de peróxido de hidrogênio H₂O₂) por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se 25 µl por poço de *Stop Solution* (H₂SO₄.2N) e finalmente procedida leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (SpectraMax M2e, Molecular Devices) a 450 nm. As concentrações de citocinas nas amostras de sobrenadante foram

calculadas por meio da comparação com uma curva padrão construída com citocinas murinas recombinantes.

A presença de nitrito no sobrenadante de cultura foi analisada por meio da Reação de Griess (GREEN et al., 1982).

Em resumo, 50 µl do sobrenadante de cada poço separadamente foram adicionados (v/v) ao reagente de Griess (0,1 % *N*-1-naphthyl-ethylenediamina em água destilada 1% sulfonamida em 5% de ácido fosfórico) em placas de 96 poços. O conteúdo de nitrito foi determinado utilizando-se curva de nitrito de sódio (NaNO₂) como padrão e procedida leitura em espectrofotômetro (Espectrofotômetro *SpectraMax 340*, *Molecular Devices*) a 540nm.

4.4 Ensaios *in vivo*

Para verificar o potencial imunomodulatório protetor das lectinas ScLL e Artin M na infecção pelo *T. gondii*, utilizamos modelo animal de camundongos C57BL/6 infectados via oral com cistos do parasito, cepa ME-49.

Após a obtenção das lectinas, a primeira etapa dos ensaios *in vivo* foi à verificação da capacidade dos camundongos resistirem às doses de lectinas propostas por nosso protocolo.

A segunda etapa foi à análise da capacidade protetora das lectinas por meio da construção de curva de sobrevivência dos camundongos infectados e tratados com protocolo experimental de lectinas ou sulfadiazina e animais não tratados.

A terceira etapa foi a análise do efeito imunomodulador das lectinas ScLL e Artin M por meio da comparação dos níveis de citocinas presente no soro dos camundongos infectados tratados com protocolo experimental de lectinas, sulfadiazina ou não tratado. Por fim, o último ensaio foi à averiguação da capacidade protetora do tratamento experimental com as lectinas por meio da análise do parasitismo no tecido cerebral de camundongos infectados e tratados com lectinas, sulfadiazina ou não tratados.

O presente estudo foi realizados com camundongos fêmeas de 8 a 10 semanas, linhagem C57BL/6 obtidos na UFU (Universidade Federal de Uberlândia), MG, Brasil, e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA) da UFU, sob condições padrões em ambiente com temperatura controlada (25°C com variação de 2°C) em ciclos de 12h de luz e 12h de escuro, com água e ração *ad libitum*. O experimento foi aprovado pelo Comitê de

Ética para Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob o protocolo de número (Anexo I).

A seguir estão descritos os procedimentos de cada etapa dos ensaios *in vivo*.

4.4.1 Teste da letalidade da dose experimental de ScLL

No presente estudo, propomos um protocolo onde cada camundongo infectado receberia 6 doses de lectinas ScLL e Artin M separadas ou combinadas. Para ScLL, cada dose foi estabelecida como 50 µg de lectina diluída em 200 µL de PBS estéril e para Artin M 1 µg diluída em 200 µL de PBS estéril. As quantidades das lectinas foram definidas com base em observações de estudos anteriores (CARDOSO et al., 2012; CARDOSO et al., 2011).

Por entender que o maior risco seria aos camundongos que receberiam a formulação contendo 6 doses de ScLL (50 µg por dose), realizamos um teste de letalidade com 5 camundongos. Sendo um animal (I) controle, que recebeu seis doses de 200 µl PBS estéril por via intraperitoneal (IP) e quatro animais (II, III, IV e V) que receberam seis doses via IP de ScLL (50 µg, 20 µg, 10 µg ou 5 µg) respectivamente, diluídas em 200 µL de solução tampão.

Os animais foram observados por 30 dias, ao final desse período todos estavam vivos e com padrões semelhantes de peso, temperatura e mobilidade na gaiola. Entendemos então, que a formulação com 6 doses de ScLL (50 µg) poderia ser utilizada nos experimentos posteriores.

4.4.2 Obtenção dos parasitos

Os cistos de *T. gondii* cepa ME-49 foram obtido do cérebro de *Calomys callosus* previamente infectados (30 a 45 dias antes) com 20 cistos por via oral, como anteriormente descrito (BARBOSA et al., 2007).

Em resumo, um animal foi sacrificado, seu cérebro removido e homogeneizado em 10 ml tampão fosfato salino (PBS; pH 7,2, 0,01M) estéril e com seringa e agulha (25x7). O material foi então lavado por centrifugação á 1000 x g por 10 minutos, em temperatura ambiente. Após a lavagem, foi feita a contagem de cistos pela adição de uma alíquota de 20 µl

da solução de suspensão, colocada entre lâmina e lamínula (24x24mm) e observada em microscópio de luz na objetiva de 10x.

Determinada a contagem, uma dose de 200 µl da solução contendo 10 cistos em PBS foi administrada as fêmeas por via oral C57BL/6, nos experimentos que se seguem.

4.4.3 Curva de Sobrevivência

Foram utilizados 25 camundongos C57BL/6 fêmeas de 8 a 10 semanas de idade divididos em cinco grupos infectados com 10 cistos cepa ME-49 via oral (VO) e tratados com ScLL e/ou Artin M.

As doses das lectinas foram administradas por via intraperitoneal (IP). O grupo I foi definido como animais tratados com ScLL (50 µg), grupo II tratados com ScLL (50 µg) e Artin M (1 µg) e Grupo III tratados com Artin M (1 µg). O Grupo IV compreendeu animais não tratados, que receberam aplicações IP de PBS estéril e o Grupo V tratados com sulfadiazina, droga padrão utilizada no tratamento da toxoplasmose (250 mg diluídas em 400ml água de beber oferecida aos animais durante 6 dias).

Grupo Tratamento	I (ScLL)	II (ScLL+Artin M)	III (Artin M)	IV (PBS)	V (Sulfadiazina)
ScLL	6x (50µg)	6x (50µg)			
Artin M		6x (1µg)	6x (1µg)		
PBS				6x (PBS)	
Sulfadiazina					250mg

As doses das lectinas foram estabelecidas com base em estudos anteriores (CARDOSO et al., 2012; CARDOSO et al., 2011).

Protocolo de tratamento

Dia (-1)-----dia (0)-----dia (1)-----dia (2)-----dia (3)-----dia (4)

1^a dose 2^a dose 3^a dose 4^a dose 5^a dose 6^a dose

Infecção

Ao término do tratamento os animais foram observados diariamente, ao final de 30 dias após a infecção todos os animais sobreviventes foram eutanasiados e seus cérebros recolhidos para realização da análise da carga parasitária.

4.4.4 Efeito imunomodulador das lectinas ScLL e Artin M na infecção por *T. gondii* *in vivo*

Foram utilizados 20 camundongos C57BL/6 fêmeas de 8 a 10 semanas de idade divididos em 4 grupos, com 5 animais por grupo infectados com 10 cistos cepa ME-49 V.O (Via Oral) e tratados conforme descrito abaixo.

As doses das lectinas foram administradas por via intraperitoneal (IP). O grupo I foi definido como animais tratados com ScLL (50 µg), grupo II tratados com ScLL (50 µg) e Artin M (1 µg), grupo III animais não tratados, receberam aplicações I.P de PBS estéril e grupo IV tratados com sulfadiazina (250 mg diluídas em 400 ml água oferecida aos animais durante 6 dias).

Grupo Tratamento	I (ScLL)	II (ScLL+Artin M)	III (PBS)	IV (Sulfadiazina)
ScLL	6x (50µg)	6x (50µg)		
Artin M		6x (1µg)		
PBS			6x (PBS)	
Sulfadiazina				250mg

O protocolo de tratamento foi idêntico ao proposto no ensaio de sobrevivência.

Dia (-1)-----dia (0)-----dia (1)-----dia (2)-----dia (3)-----dia (4)

1^odose 2^adose 3^adose 4^adose 5^adose 6^adose

Infecção

Foram realizadas duas sangrias nos animais, uma antes do tratamento com os animais ainda não infectados e outra um dia após o término do tratamento. Após a sangria os soros foram separados do sangue total e guardados em freezer a -70°C para posterior dosagem de citocinas.

A detecção de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF) foi realizada pelo método de citometria de fluxo utilizando o kit *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1, Th2, Th17 Cytokine Kit (BD®Biosciences, USA)*. Em resumo, os soros e as curvas de concentração padrão das citocinas do kit foram incubados em tubos de poliestireno, fundo redondo com *beads* de captura recobertas com anticorpos específicos para cada citocina, e com anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após a incubação, foi adicionada 500 μ l de solução de lavagem, os tubos foram centrifugados a 1300 rpm, 18°C por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram ressuspensas em 200 μ l de solução de lavagem, por fim foi efetuada a leitura no aparelho FACSCanto II (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). Os resultados obtidos foram analisados pelo software *FlowJo BD CBA Analysis Software* por meio da obtenção de curvas de calibração obtidas dos padrões de citocinas do kit, sendo a concentração dos analitos na amostra determinado em pg/mL.

Ao término do tratamento os animais foram observados diariamente, ao final de 30 dias após a infecção todos os animais foram eutanasiados e seus cérebros recolhidos para realização da análise da carga parasitária.

4.4.5 Análise do parasitismo por qPCR

Para avaliar o efeito no controle da infecção pelo *T. gondii* dos camundongos tratados com ScLL, Artin M e ScLL, sulfadiazina e não tratados (PBS) foi realizado PCR quantitativa a partir de amostras de tecido do cérebro dos animais.

A presença do DNA de *T. gondii* no tecido cerebral dos animais sobreviventes do ensaio de curva de sobrevivência e dos utilizados para análise de citocinas (segunda e terceira etapa respectivamente dos ensaios *in vivo*) foi investigada por PCR quantitativa.

A extração de DNA foi realizada utilizando Proteinase K (PK) (*Promega Corporation*) com adaptações para extração a partir de tecido do protocolo de MILLER; DYKES; POLESKY (1988). O aproximadamente 100 mg de tecido cerebral foi tratado com 500 µl de Tampão NLB, 16 µl de SDS 10% e 8 µl de Solução PK 50°C overnight.

As amostras foram então submetidas à extração pela adição de Tampão NaCl 6 M\centrifugações\etanol absoluto\ etanol 75%\ . Ao final do processo o DNA total foi precipitado e o pellet ressuspensionado com 200 µl de dH₂O. A quantificação do DNA extraído foi determinada por espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis *Thermo Scientific*) UV (260nm) e ajustada 20ng/mL com água estéril livre de DNase.

A quantificação do DNA de *T. gondii* no DNA total foi realizada por meio do sistema SYBER *green* (Ivotrogen, San Francisco, CA) conforme anteriormente descrito por EDVINSSON et al. (2006). Foram utilizados os seguintes pares de primers: (*Forward*: 5'-GCTCCTCCAAGCGTCTTG-3'; *Reverse*: 5'-TCCTCACCTCGCCTTCA-3').

Os ensaios para quantificar o grau de parasitismo cerebral foram realizados no equipamento de PCR em tempo real (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e a contagem de parasitos foi calculada pela interpolação da curva padrão com quantidades equivalentes de DNA extraídos de 10⁶ taquizoítos de isolado de *T. gondii* mantidos em cultura. Os resultados foram expressos em concentração da relação de picogramas de DNA do parasito por microgramas do DNA de camundongo.

4.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão para os experimentos de dosagem de citocinas, tanto *in vivo* como *in vitro* e na dosagem de nitrito. Nos ensaios *in vivo* a comparação dos dados foi feita entre todos os grupos com o grupo controle (RPMI) pelo teste de ANOVA (“one- way”) e pelo pós-teste de

comparação múltipla de Dunnett's. A comparação entre os níveis de citocinas após o tratamento experimental no ensaio *in vivo* foi realizada entre todos os grupos de uma só vez pelo teste de ANOVA ("one-way") e pelo pós-teste de comparação múltipla de Tukey's. A comparação das curvas de sobrevivência dos camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* e tratados com lectinas, sulfadiazina ou PBS foi realizada pelo método de Log-Hank. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 Resultados

5.1 Adaptação do protocolo de extração da lectina ScLL

As adaptações no protocolo de CARDOSO et al (2012) mostraram-se eficientes e não interferiram no grau de pureza da lectina ScLL. A homogeneidade e pureza do material extraído foram verificadas pela análise eletroforética do extrato total do látex de *S. carinatum* em gel de poliacrilamida 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) coradas com *Coomassie Brilliant Blue* (Figura 3).

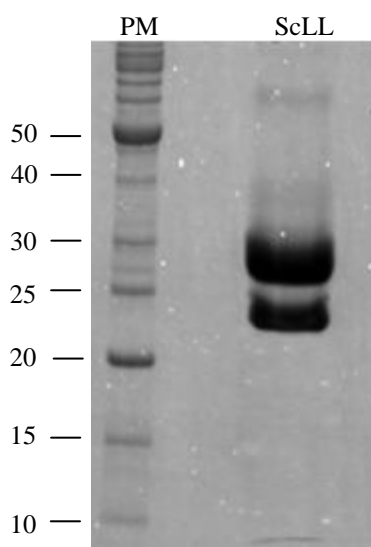


Figura 3. Perfil eletroforético da lectina ScLL em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12% corado com *Coomassie blue*. PM: marcador de peso molecular, expresso em kiloDaltons (kDa).

5.2 Ensaios *in vitro*

5.2.1 Atividade citotóxica das lectinas ScLL ou Artin M

A porcentagem de viabilidade celular de macrófagos (BMDMs) na presença de diferentes quantidades de ScLL e Artin M foi determinada. Com relação à ScLL, foram observadas taxas superiores a 80% de viabilidade celular em quantidades iguais ou inferiores a 1.8µg da lectina (Figura 4). Em relação à Artin M, não observamos efeito citotóxico

considerável nas quantidades de lectina testadas, a taxas de viabilidade celular mantiveram-se sempre superiores a 80% (Figura 5).

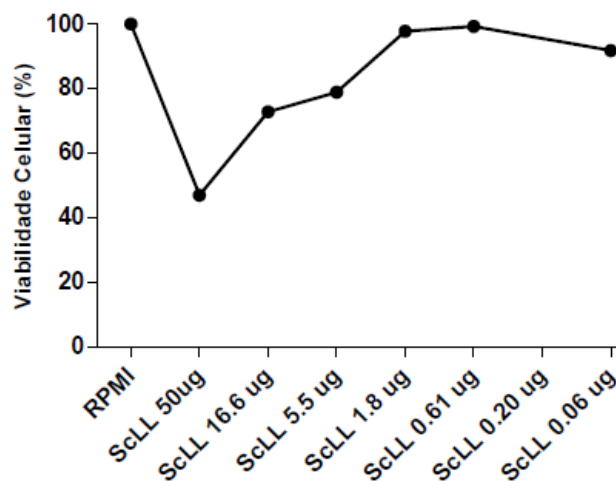


Figura 4. Atividade citotóxica da lectina ScLL *in vitro* determinada por ensaio de MTT. Macrófagos (BMDMs) foram incubados em placa de 96 poços com ScLL (50 μ g, 16,6 μ g, 5,5 μ g, 1,8 μ g, 0,61 μ g, 0,20 μ g e 0,06 μ g). *A quantidade de ScLL refere-se a massa de lectina aplicada por poço ou meio de cultura (controle) por 24 horas. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis. Os dados são representativos de um experimento realizado em quadruplicada.

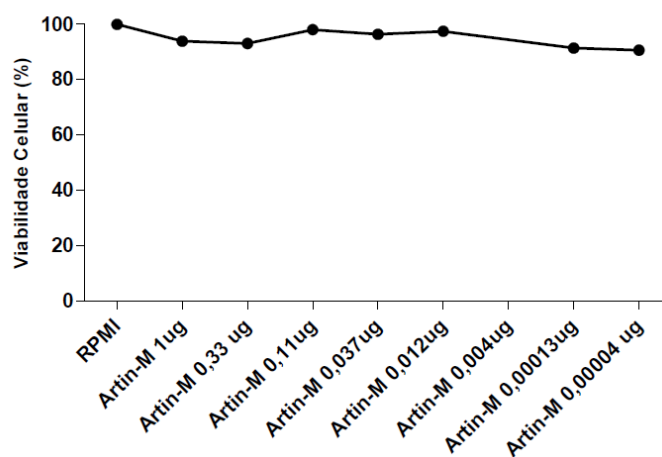


Figura 5. Atividade citotóxica da lectina Artin M *in vitro* determinada por ensaio de MTT. Macrófagos (BMDMs) foram incubados em placa de 96 poços com Artin M (1 μ g, 0,33 μ g, 0,11 μ g, 0,037 μ g, 0,012 μ g, 0,004 μ g, 0,00013 μ g, 0,00004 μ g). *A quantidade de Artin M refere-se a massa de lectina aplicada por poço ou meio de cultura (controle) por 48 horas. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis. Os dados são representativos de um experimento realizado em quadruplicada.

5.2.2 Determinação da produção de citocinas e nitrito em sobrenadantes de macrófagos murinos após a estimulação com diferentes concentrações de ScLL ou Artin M

A produção de citocinas foi analisada no sobrenadante de cultura de macrófagos murinos (BMDMs) após estímulo com diferentes concentrações de ScLL e Artin M (Figura 6 e 7).

Níveis de IL-12 foram significativamente elevados após 24 horas de estímulo com as concentrações das lectinas ScLL (1,8 , 0,61 e 0,20 $\mu\text{g/mL}$) e Artin M (0,33 e 0.11 $\mu\text{g/mL}$) em relação ao meio de cultura (ANOVA, $p<0.05$) (Figura 6A e 7A). Analisando a produção de IL-10, não encontramos níveis significativamente maiores que o meio de cultura quando as células foram estimuladas com ScLL (Figura 6B). Em contraste, Artin M nas concentrações de 1,0 e 0,33 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de estimular significativamente as células (ANOVA $p<0,05$) (Figura 7B).

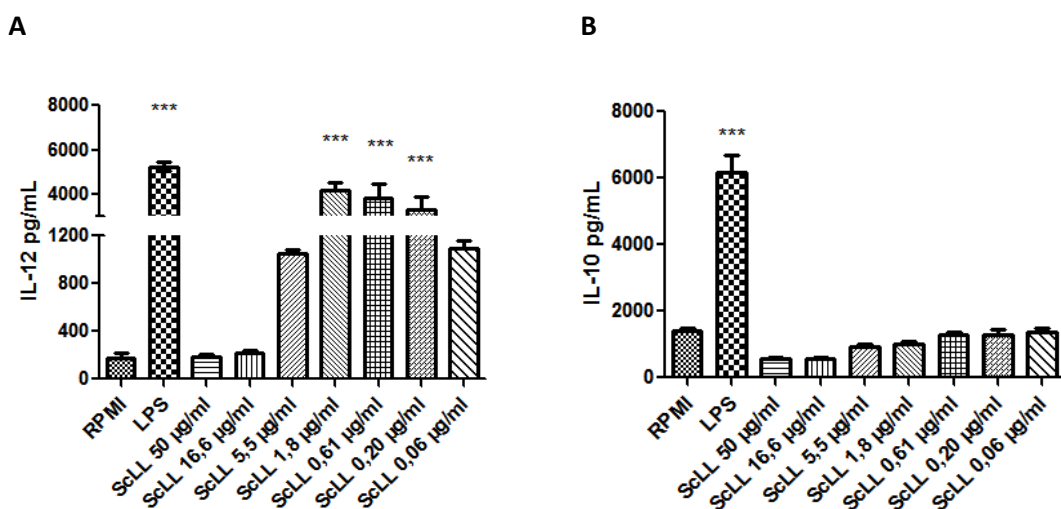


Figura 6. Quantificação de citocinas em sobrenadante e cultura de macrófagos (BMDMs) após estímulo com diferentes concentrações da lectina ScLL. Níveis de IL-12 (A) e IL-10 (B) no sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados com diferentes concentrações de ScLL, LPS ou somente meio após 24 h de incubação. Os níveis das citocinas foram mensurados por ELISA sanduíche. Resultados são expressos como média \pm desvio padrão obtidas de culturas em triplicata. A comparação estatística entre macrófagos estimulados com diferentes concentrações de ScLL ou LPS com meio (RPMI) foi feita por ANOVA.*** $p<0,0001$.

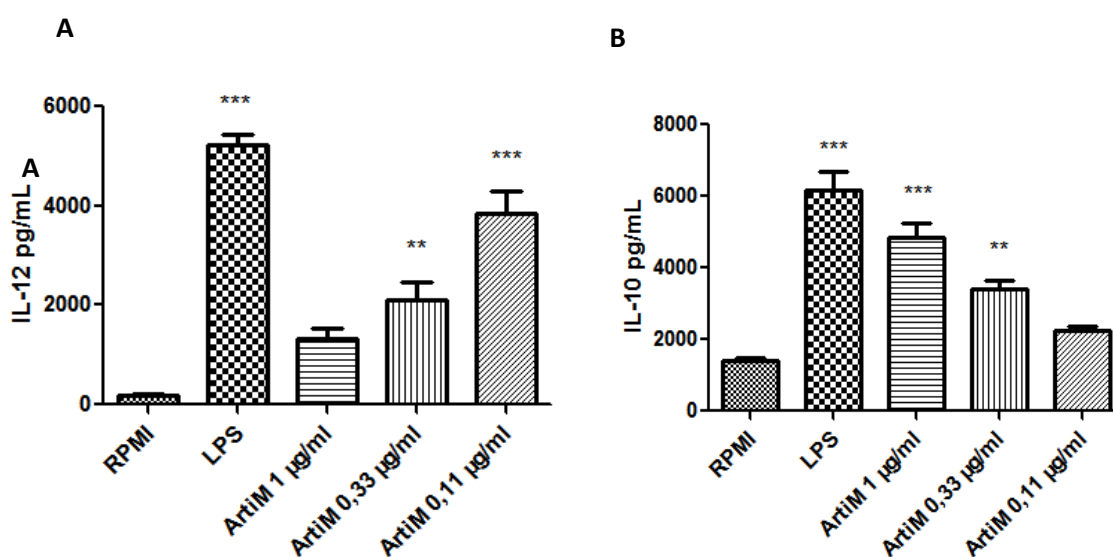


Figura 7. Quantificação de citocinas em sobrenadante e cultura de macrófagos (BMDMs) após estímulo com diferentes concentrações da lectina Artin M. Níveis de IL-12 (A) e IL-10 (B) no sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados com diferentes concentrações de Artin M, LPS ou somente meio após 24 h de incubação. Os níveis das citocinas foram mensurados por ELISA sanduíche. Resultados são expressos como média \pm desvio padrão obtidas de culturas em triplicata. A comparação estatística entre macrófagos estimulados com diferentes concentrações de Artin M ou LPS com meio (RPMI) foi feita por ANOVA. *** $p < 0,0001$. ** $p < 0,001$.

Como indicativo da produção de NO, os níveis de nitrito foram mensurados no sobrenadante de cultura de macrófagos (BMDMs) estimulados com as lectinas ScLL, Artin M, LPS ou somente meio (RPMI). Níveis significativamente maiores de NO foram produzidos pelos macrófagos quando incubados por 48 horas com ScLL (1,8 e 0,61 µg/mL) e Artin M (1,0,0,33 e 0,11 µg/mL) em comparação com o meio de cultura (ANOVA, $p < 0,005$) (Figura 8A e B).

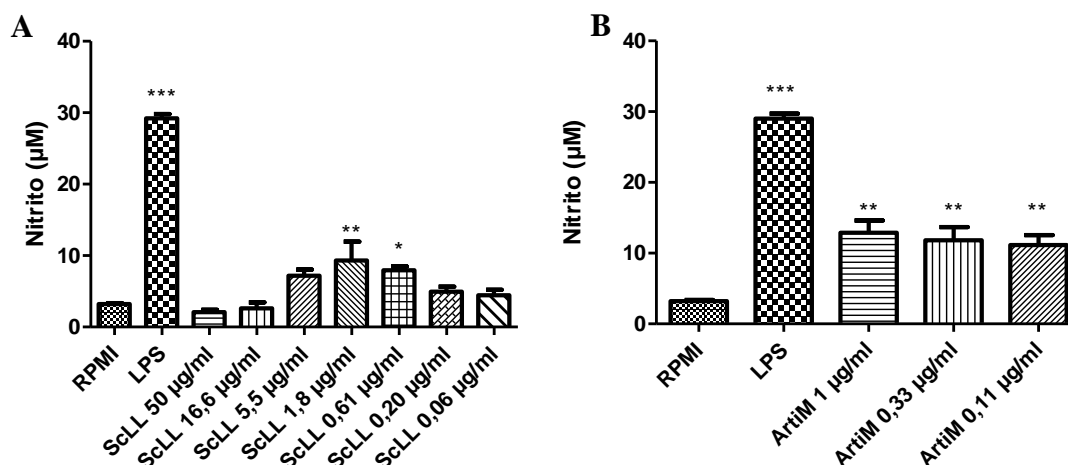


Figura 8. Quantificação de nitrito em sobrenadante e cultura de macrófagos (BMDMs) após estímulo com diferentes concentrações das lectinas ScLL ou Artin M. Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos (BMDMs) estimulados com diferentes concentrações de ScLL, Artin M, LPS ou somente meio. A concentração de nitrito no sobrenadante de cultura após 24 h de incubação foi determinada pelo método de Griess. Os dados são representativos de um experimento realizado em triplicata para cada condição. A comparação estatística entre níveis de nitrito de macrófagos estimulados com diferentes concentrações das lectinas (ScLL ou Artin M) ou LPS com meio (RPMI) foi feita por ANOVA.*** $p < 0,0001$. ** $p < 0,001$. * $p < 0,01$.

5.3 Ensaios *in vivo*

5.3.1 Avaliação da letalidade da lectina ScLL

Cinco animais, sendo um animal (I) controle que recebeu seis doses de 200 μl PBS estéril por via intraperitoneal (IP) e quatro animais (II, III, IV e V) receberam seis doses via IP de ScLL (50 μg, 20 μg, 10 μg ou 5 μg) respectivamente, diluídas em 200 μL de solução tampão. O limite superior de 50 μg foi definido com base em estudo anterior de imunização (CARDOSO et al., 2012). Os animais foram observados diariamente ao longo de trinta dias. Não ocorreu morte de nenhum animal, sendo estabelecida a maior quantidade (50 μg) de ScLL para o tratamento.

5.3.2 Avaliação da mortalidade dos animais C57BL/6 infectados com *T. gondii* e tratados com ScLL, Artin M, ScLL e Artin M ou sulfadiazina

Os camundongos foram observados diariamente quanto à mortalidade após a infecção pelo *T. gondii* e o tratamento experimental com as lectinas. O acompanhamento da mortalidade seguiu até o 30º dia de infecção, quando os animais foram eutanasiados.

Todos os camundongos C57BL/6 infectados e tratados com ScLL ou sulfadiazina sobreviveram até o 30º dia após a infecção (Figura 9). Com relação ao tratamento com a combinação de ScLL com Artin M, 80% dos animais infectados sobreviveram até o dia do sacrifício. O grupo tratado com Artin M apresentou taxa de sobrevivência de 60%. Apenas um animal C57BL/6 do grupo infectado e não tratado sobreviveu à infecção por *T. gondii* (Figura 9). Foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a curva de sobrevivência dos animais submetidos ao tratamento com ScLL ou sulfadiazina e ao grupo controle negativo (animais infectados e tratados com PBS).

Os dados indicam que o tratamento experimental para os camundongos C57BL/6 com ScLL, Artin M ou a combinação de ScLL e Artin M parece estar relacionado a diminuição da taxa de mortalidade durante a infecção pelo *T. gondii*.

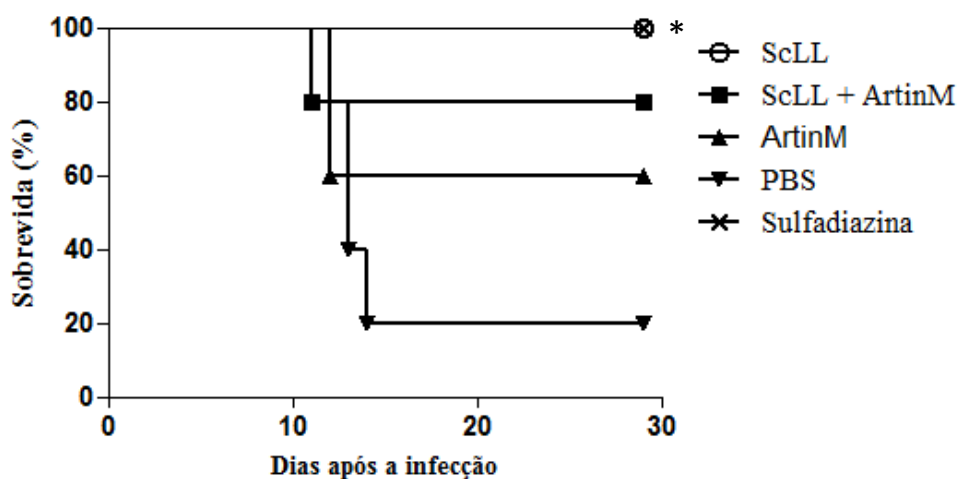


Figura 9. Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 após a infecção com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e tratamento com ScLL, ScLL e Artin M, Artin M e sulfadiazina. Os animais foram tratados com 6 doses de lectinas, ScLL (50 µg por dose), ScLL e Artin M (50 µg + 1 µg por dose respectivamente), Artin M (1 µg por dose) e sulfadiazina (250 mg: água de bebida, durante 6 dias). As curvas de sobrevivência dos animais submetidos ao tratamento com ScLL e sulfadiazina foram significativamente maiores que aquela dos animais infectados e tratados com PBS (grupo controle negativo). Teste do Quiquadrado (χ^2) e log-rank teste.

5.3.3 Efeito imunomodulador das lectinas ScLL e Artin M no controle da infecção por *T. gondii* *in vivo*

Com o intuito de verificar se as lectinas ScLL e Artin M exerceriam efeito imunomodulador capaz de conferir proteção à infecção pelo *T. gondii*, os níveis de diferentes citocinas foram mensurados em amostras de soro de camundongos infectados com o parasito e submetidos ao tratamento experimental.

O soro de todos os camundongos foram coletados no início do ensaio, antes da infecção ou qualquer manipulação (NT-não tratado/NI-não infectado). Após a infecção com 10 cistos de *T. gondii* cepa ME-49, os animais foram divididos em quatro grupos e tratados conforme protocolo proposto. Um dia após a administração da última dose do tratamento, foi realizada nova coleta de soro.

Os dados indicam que as lectinas foram capazes de modular a resposta imune dos animais que receberam o tratamento (Figura 10), estimulando a produção de citocinas tanto do padrão Th1 como Th2 e também Th17. O nível de diferentes citocinas, dosadas ao término do tratamento foram significativamente maiores (ANOVA, $p < 0,05$) nos grupos tratados com lectinas quando comparados ao grupo controle (que receberam apenas PBS) e ao grupo tratado com sulfadiazina.

Foi observado que os animais tratados com ScLL apresentaram maiores quantidade de IL-2 e IFN- γ comparados com os animais tratados com sulfadiazina, ScLL e Artin M e o grupo de animais não tratados (grupo PBS) (Figura 10A e B), sendo que essa maior produção foi estatisticamente significativa (ANOVA $p < 0,05$).

Os níveis de IL-4 foram significativamente maiores nos animais tratados com ScLL ou com a combinação de ScLL e Artin M em relação aos tratados com sulfadiazina (ANOVA $p < 0,05$), contudo não foi observado diferença estatística entre os níveis dessa citocina nos animais tratados com as lectinas e não tratados (Figura 10C). Em relação à produção de IL-6, os animais tratados com ScLL ou Artin M e ScLL apresentaram níveis mais elevados da citocina no soro que os animais tratados com sulfadiazina ou não tratados (Figura 10D).

Observando os resultados, verificamos que a combinação das lectinas Artin M e ScLL possui maior tendência em induzir o aumento de citocinas regulatórias, que ScLL sozinha. Os níveis de IL-10 e IL-17 foram detectados em maior concentração nos animais tratados com a

combinação de ScLL e Artin M em relação aos demais grupos (Figura 10E e F) (ANOVA $p < 0,05$).

Por fim, em relação aos níveis de TNF, embora tenhamos verificado uma tendência da lectina ScLL em induzir sua produção, o tratamento com as lectinas não alterou significativamente a produção de TNF (Figura 10G).

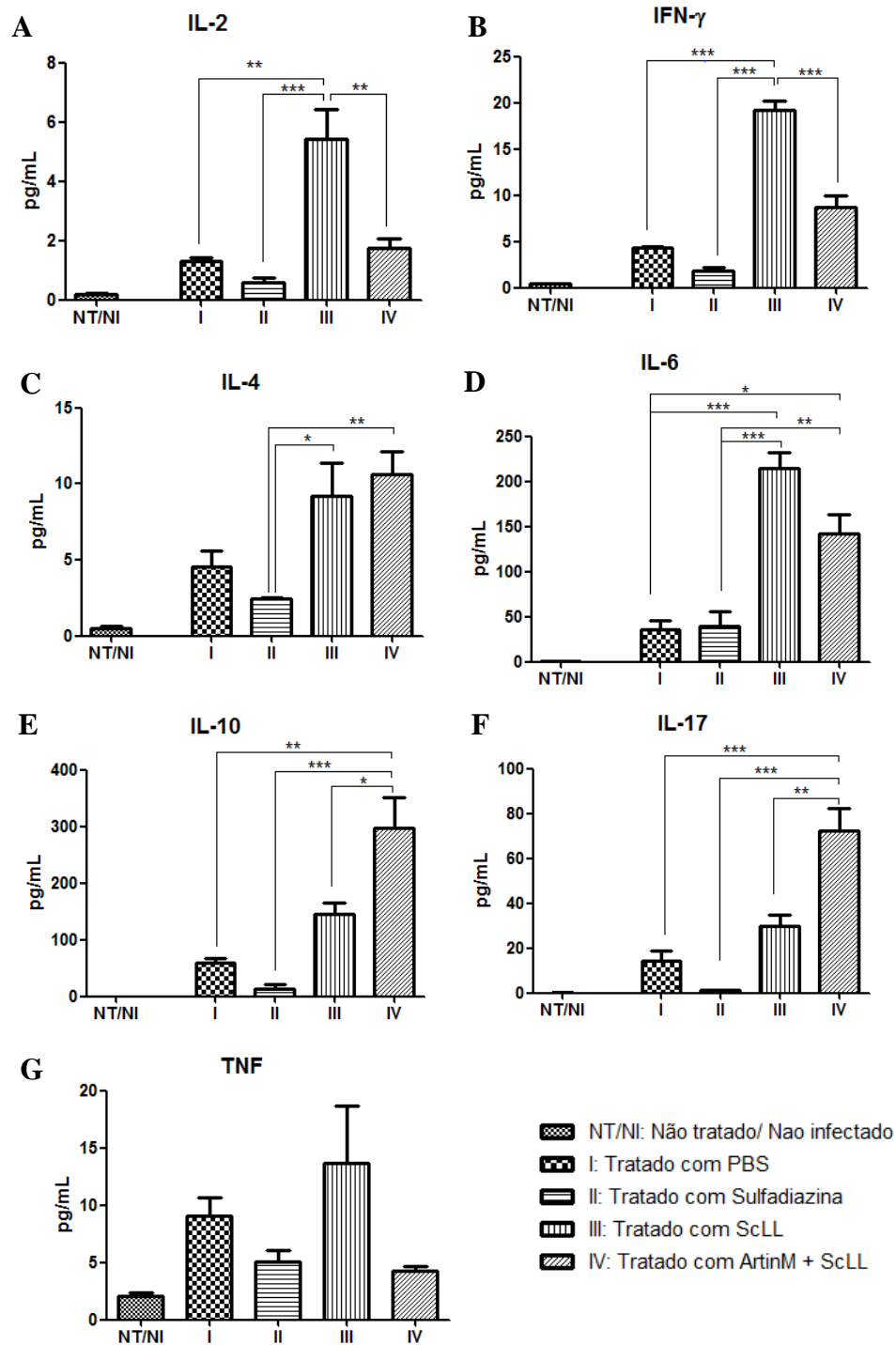


Figura 10. Níveis de citocinas em amostras de soro de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* tratados com ScLL, Artin M e ScLL, sulfadiazina ou PBS. Os níveis de citocinas foram quantificados de amostras coletadas antes da infecção e do início do tratamento e um dia após o término, com os animais infectados. Os dados são representativos de amostras em triplicata para cada animal nas condições NT/Ni, I, II, III ou IV. Os níveis de IFN- γ (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-10 (E), IL-17 (F) e TNF (G) foram mensurados por citometria de fluxo. *Diferença estatística entre níveis de citocinas comparados simultaneamente entre todas as condições (ANOVA. *** $p < 0,0001$. ** $p < 0,001$. * $p < 0,01$).

5.3.4 Análise do parasitismo por PCR quantitativa

Após o tratamento experimental com as lectinas, sulfadiazina ou PBS a carga parasitária cerebral dos camundongos infectados com *T. gondii* foi determinada por PCR em tempo real (Figura 11). Foram utilizadas amostras tanto dos animais submetidos ao ensaio de curva de sobrevivência quanto os utilizados para dosagem de citocinas.

Camundongos tratados com ScLL ou Artin M + ScLL, demonstraram carga parasitária cerebral significativamente menor em relação ao grupo controle (PBS) (ANOVA. $p < 0,05$). Os camundongos tratados com sulfadiazina também apresentaram carga parasitária cerebral significativamente menor em relação ao grupo controle.

Os resultados indicam que o tratamento com ScLL ou Artin M e ScLL reduziu a proliferação de *T. gondii* com efeito relevante. Comparando o tratamento experimental com o de sulfadiazina podemos verificar neste modelo de estudo, igual capacidade de controle da infecção pelo *T. gondii*. Os resultados sugerem que ação protetora das lectinas pode ocorrer por meio da sua capacidade imunomoduladora.

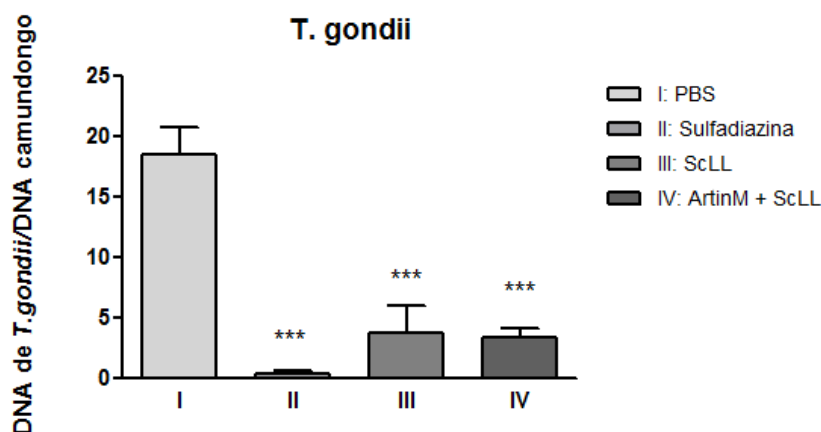


Figura 11. Análise do parasitismo no cérebro de camundongos C57BL/6 infetados com 10 cistos via oral de *T. gondii* cepa ME-49 tratados com ScLL, Artin M e ScLL, sulfadiazina ou PBS. O efeito do tratamento proposto com as lectinas ScLL ou Artin M e ScLL no controle da infecção pelo *T. gondii* foi avaliado pela análise da carga parasitária cerebral dos camundongos 30 dias após a infecção. A quantificação de DNA do parasito foi realizada por meio de PCR em tempo real. Os índices de parasitismo nos animais dos grupos tratados (II, III e IV) foram comparados com os dos animais do grupo PBS (I). *Diferença estatística entre níveis de parasitismo comparados entre os grupos tratados com grupo PBS (ANOVA. *** $p < 0,0001$).



6 Discussão

O tratamento convencional para a toxoplasmose consiste na administração de uma combinação de fármacos. O critério de seleção e definição a respeito da combinação e dose dos medicamentos leva em conta fatores como, forma de manifestação clínica da doença, característica imunológica do hospedeiro como crianças imunodeprimidas infectados pelo vírus HIV e no caso de gestantes o período gestacional. Entre os fármacos atualmente administrados temos sulfadiazina, pirimetamina, dapsona, clindamicina e espiramicina (BRASIL, 2014; BRASIL, 2010).

Todavia, este tratamento possui efeitos colaterais danosos ao hospedeiro devido à toxicidade da medicação administrada. Além disso, recentemente tem se observado o desenvolvimento de resistência do *T. gondii* as drogas disponíveis, exigindo a administração de combinação cada vez maior de medicamentos. Nesse sentido, novas alternativas ao tratamento da toxoplasmose são necessárias (ANDREWS et al., 2014; SEPULVEDA-ARIAS; VELOZA; MANTILLA-MURIEL, 2015).

Analizando os dados publicados até a presente data, este é o primeiro trabalho em que se propõe a utilização das lectinas ScLL e Artin M como ferramentas no tratamento a toxoplasmose.

Lectinas são proteínas envolvidas no processo de interação proteína-carboidrato (SOUZA et al., 2013). Sabe-se que as interações proteína-carboidrato são essenciais para a indução de resposta imune, nesse sentido lectinas desempenham papel importante nos fenômenos de ativação celular e modulação da resposta imune. Lectinas ativam as células da resposta imune pela ligação com os receptores de superfície celular, como os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (LANNOO; VAN DAMME, 2014; VASTA, 2009).

A interação de lectinas com glicanos da superfície das células imunes implica na sua participação em diferentes fenômenos biológicos, tais como regulação da ativação, migração e adesão de macrófagos, células dendríticas e linfócitos, sendo, portanto uma potencial ferramenta para o tratamento de infecções parasitárias (PRANCHEVICIUS et al., 2012).

Devido a seu efeito imunoestimulatório as lectinas ScLL e Artin M já foram utilizadas em diferentes modelos de infecções parasitárias (AFONSO-CARDOSO et al., 2007; AFONSO-CARDOSO et al., 2011; PANUNTO-CASTELO et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2006). Entre estes temos estudos realizados com ScLL como fator de proteção a infecção por *Leishmania amazonensis* (AFONSO-CARDOSO et al., 2007), imunização contra *Neospora*

caninum (CARDOSO et al., 2012) e ação imunorreguladora em modelo murino de asma (ROGERIO et al., 2007).

Com relação à lectina Artin M, além de seu efeito imunoestimulador positivo em doenças parasitárias, foi demonstrado seu efeito protetor em modelo murino de infecção pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (COLTRI et al., 2010).

Em nosso trabalho utilizamos a lectina purificada do extrato aquoso da Euphorbiaceae *S. carinatum* e a lectina extraída das sementes de *A. heterophyllus* para promover a imunomodulação de camundongos C57BL/6 infectados com cistos de *T. gondii* cepa ME-49 a fim de auxiliar a resposta imune dos hospedeiros no combate ao parasito, buscando assim nova alternativa no tratamento à toxoplasmose.

Antes de dar início aos ensaios *in vivo*, realizamos experimentos *in vitro* para verificar a capacidade das lectinas purificadas em promover ativação celular. Para tanto, utilizamos modelo de macrófagos murinos derivados da medula óssea (BMDMs).

O primeiro teste realizado foi a análise do potencial citotóxico das lectinas ScLL e Artin M. As quantidades iniciais de lectinas utilizadas (50 µg para ScLL e 1 µg para Artin M) foram definidas com base em estudos anteriores (AFONSO-CARDOSO et al., 2007; AFONSO-CARDOSO et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 1999; CARDOSO et al., 2012; SANTOS-DE-OLIVEIRA et al., 1994).

Observou-se que ScLL em quantidades superiores a 1,8 µg mostraram efeito citotóxico, enquanto Artin M na quantidade proposta (1µg) não resultou em citotoxicidade em macrófagos.

Na etapa seguinte, verificamos a capacidade das lectinas purificadas em promover a produção de citocinas inflamatória e regulatória. Nossos experimentos demonstraram que tanto ScLL quanto Artin M são capazes de induzirem macrófagos a produzirem IL-12.

Segundo estudos realizados, a ativação dos macrófagos ocorre por meio da ligação entre lectinas e porções de glicano da superfície celular (PANUNTO-CASTELO et al., 2001). Lectinas utilizam receptores do tipo TLR (Receptores Semelhantes à *Toll*), para promover a ativação das células imunes, a exemplo da lectina Artin M que interagi com receptor TLR2 promovendo indução da expressão de citocinas (MARIANO et al., 2014).

Além de macrófagos, neutrófilos e células dendríticas também são capazes de produzir IL-12. Esta citocina é fundamental na resposta imune contra o *T. gondii*, uma vez que

estimula a produção de IFN- γ pelos linfócitos da imunidade inata (células NK-*natural killer*) (SANECKA; FRICKEL, 2012). IL-12, também está envolvida no processo de resistência a infecção pelo *T. gondii* no sistema nervoso central (SNC), por estimular a produção de IFN- γ por células imunes do SNC capaz de controlar a proliferação de taquizoítos do parasito no cérebro (SUZUKI et al., 2011).

Analisando a capacidade regulatória das lectinas, em nossos ensaios *in vitro* verificamos que Artin M apresentou maior capacidade para induzir a produção de IL-10 quando comparada a ScLL. Somente a lectina Artin M foi capaz de estimular de maneira significativa a produção de IL-10. Artin M no ensaio realizado apresentou uma relação dose dependente direta com IL-10, ou seja, à medida que a concentração da lectina era reduzida a quantidade de IL-10 no sobrenadante de cultura era menor, ao passo que a redução na concentração de Artin M induzia o aumento de IL-12.

Citocinas regulatórias como IL-10 controlam a resposta imune minimizando os danos causados pela inflamação, atuando como mecanismo de controle fisiológico. IL-10 conduz a resposta imune para o perfil Th2 à medida que inibe o padrão Th1. O balanço entre respostas inflamatórias e anti-inflamatórias garante a redução dos danos causados pela infecção do *T. gondii* (DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012).

A capacidade das lectinas ScLL e Artin M em estimular células imunes a produzirem citocinas foi verificada em diferentes estudos. Em estudo realizado com *L. amazonensis* e ScLL, foi verificado o aumento da expressão de mRNA dos genes de IL-12 e TNF em macrófagos pré-tratados com a lectina (AFONSO-CARDOSO et al., 2011). A modulação da resposta imune, por meio do estímulo da produção de IL-12, IL-10 e TNF por Artin M foi verificada em diferentes modelos de infecções, tanto parasitária como fúngicas (COLTRI et al., 2010; PANUNTO-CASTELO et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2006).

Juntamente com as citocinas IL-12 e IL-10, realizamos a dosagem de nitrito no sobrenadante de cultura como marcador indireto da capacidade de ScLL e Artin M em estimular macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO). Nossos resultados mostraram que ambas as lectinas foram capazes de induzir significativamente a produção de NO, revelando mais uma vez sua capacidade de ativação dos mecanismos efetores da resposta imune.

As moléculas de NO podem ser produzidas por monócitos inflamatórios e macrófagos exercem função antiparasitária e atuam como mediadores inflamatórios, participando efetivamente do controle da infecção pelo *T. gondii* (DUNAY; SIBLEY, 2010). NO é

sintetizado nas células por meio da ação de um grupo de isoenzimas conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS), por meio da catálise enzimática do aminoácido L-arginina (DUNCAN, 2003). A redução da oferta de arginina ao *T. gondii* causa alterações em seu ciclo reprodutivo, reduzindo as formas de multiplicação rápida (taquizoítos) (FOX; GIGLEY; BZIK, 2004).

Após as análises *in vitro*, demos início a segunda etapa do nosso trabalho verificando o efeito das lectinas ScLL e Artin M modelo murino infectados pelo *T. gondii* cepa ME-49.

Foram utilizados no primeiro ensaio 25 animais distribuídos em 5 grupos (5 animais por grupo), todos infetados via oral com cistos de ME-49. Os animais foram tratados com lectinas ScLL, Artin M ou a combinação de ScLL e Artin M e comparados com animais tratados com sulfadiazina. Analisamos o padrão de sobrevivência dos diferentes grupos ao final de 30 dias após a infecção. No grupo não tratado o índice de sobrevivência foi de apenas 20%, já nos grupos tratados com a lectina ScLL houve a sobrevivência de 100% similar ao índice de sobrevivência do grupo tratado com sulfadiazina. Para o grupo tratado com a combinação de Artin M e ScLL a taxa de sobrevivência foi de 80% e por fim o grupo tratado com Artin M este índice foi de 60%.

A segunda etapa dos experimentos *in vivo* foi verificar o efeito modulatório das lectinas em animais infectados e submetidos ao protocolo experimental de tratamento, para isso realizamos a dosagem de citocinas do perfil Th1 e Th2 no soro dos camundongos.

Neste ensaio utilizamos 20 animais divididos em 4 grupos (5 animais por grupo), sendo um grupo controle negativo e não tratado, um grupo controle positivo, tratado com sulfadiazina e dois grupos tratados com lectinas, ScLL e a combinação de Artin M e ScLL. A coleta do soro foi realizada antes da infecção e do início do tratamento e um dia após o término do tratamento. Nossos resultados mostraram que a lectina ScLL e a combinação de Artin M e ScLL foram capazes de modular a resposta imune dos camundongos resultando no aumento dos níveis tanto de citocinas do padrão Th1 como Th2.

Os camundongos tratados com ScLL apresentaram níveis significativamente maiores de IL-2 e IFN- γ quando comparados aos grupos controle, não tratados e tratados com sulfadiazina, demonstrado a capacidade desta lectina em induzir respostas de perfil Th1. A capacidade de induzir resposta pró-inflamatória, perfil Th1, da lectina ScLL *in vivo* foi primeiramente descrita em modelo com camundongos BALB/c desafiados contra *L. amazonensis* (AFONSO-CARDOSO et al., 2007).

ScLL e Artin M combinada a ScLL, induziram o aumento nos níveis de IL-6, significativamente maiores que os grupos controle. IL-6 é uma citocina de perfil inflamatório que possui efeito sinérgico com IFN- γ no estímulo e adequação da resposta imune contra *T. gondii* (LANG; GROSS; LUDER, 2007).

A combinação de Artin M e ScLL foi mais efetiva que ScLL sozinha em induzir citocinas do padrão Th2, os níveis de IL-4 e IL-10 no grupo tratado com a combinação das lectinas foram significativamente maiores quando comparados aos animais dos grupos controle. O balanço da resposta imune, mediado por citocinas regulatórias na infecção pelo *T. gondii*, é importante por prevenir danos teciduais ao hospedeiro causados por excesso de resposta inflamatória (GAZZINELLI et al., 1996).

Os camundongos tratados com a combinação das lectinas também apresentaram aumento nos níveis de IL-17 quando comparados aos grupos controle. IL-17 é produzida por linfócitos efetores Th17 que contribuem para o controle das respostas inflamatórias durante infecções parasitárias (KORN et al., 2009; MESQUITA JUNIOR et al., 2010).

Os 20 animais submetidos ao experimento foram eutanasiados 30 dias após a infecção para coleta do cérebro e análise da carga parasitária. A quantificação de parasitos no tecido cerebral foi feita por meio da técnica de PCR quantitativa (qPCR). Este método é altamente sensível e apropriado para determinar taxas de parasitismo em modelos animais de infecções por *T. gondii* (LIN et al., 2000).

Como esperado, a maior taxa de parasitismo foi encontrada no grupo estabelecido como controle negativo (não tratado), camundongos dos grupos tratados com as lectinas, ScLL ou Artin M e ScLL apresentaram carga parasitária cerebral significativamente menor que os camundongos do grupo controle negativo, indicando eficiência do protocolo experimental de tratamento.

A redução da carga parasitária decorrente da ação das lectinas ScLL e Artin M foi observada em estudos anteriores com outros modelos de infecção. Um estudo observou que a associação ente Artin M e o antígeno solúvel de *L. amazonensis* (SLA) induziu a produção de IFN- γ em camundongos BALB/c, diminuindo a carga parasitária dos animais desafiados contra promastigotas de *L. amazonensis* (TEIXEIRA et al., 2006). Pesquisadores também verificaram em modelo de imunização, que a associação ente ScLL e o antígeno solúvel de *Neospora caninum* (NLA) resultou em menor taxa de parasitos no SNC dos animais (CARDOSO et al., 2012).

No presente estudo, o padrão da resposta imune observado nos animais infectados com *T. gondii* e tratados com as lectinas pode ter influenciado na carga parasitária cerebral, propiciando aos camundongos uma resposta imune mais eficiente contra o parasito.

7 Conclusões

- As lectinas ScLL e Artin M exerceram atividade imunomoduladora em macrófagos (BMDMs), sendo capazes de aumentar os níveis de IL-12, IL-10 e NO em comparação as células incubadas apenas com meio RPMI. A lectina ScLL induziu maiores níveis de IL-12 enquanto que Artin M induziu maior produção tanto de IL-12 como de IL-10.
- O parasitismo tecidual no cérebro de camundongos C57BL/6 dos grupos submetidos ao tratamento com as lectinas foi significativamente menor quando comparado ao grupo dos não tratados. O efeito na redução do parasitismo dos animais tratados com ScLL ou Artin M e ScLL foi similar ao dos animais tratados com sulfadiazina.
- O tratamento com as lectinas ScLL ou Artin M e ScLL foi capaz de reduzir o número de mortes de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*. Os grupos de animais tratados com as lectinas, separadamente ou em conjunto apresentaram maiores taxas de sobrevivência quando comparado ao grupo de animais não tratados.
- As lectinas ScLL e Artin M exerceram efeito imunomodulatório *in vivo*. Os níveis de citocinas Th1, Th2 e Th17 foram maiores em camundongos C57BL/6 tratados com ScLL ou com a combinação de Artin M e ScLL quando comparados aos animais não tratados e aos tratados com sulfadiazina. ScLL induziu o aumento significativo de IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-6, enquanto que a combinação de Artin M e ScLL induziu significativamente o aumento dos níveis de IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17.

Em síntese, os dados do presente estudo sugerem que os mecanismos imunomoduladores mediados pelas lectinas ScLL e Artin M podem contribuir para o controle da infecção pelo *T. gondii*.



Referências

AFONSO-CARDOSO, S. R. et al. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. **Korean J Parasitol**, v. 45, n. 4, p. 255-66, Dec 2007.

AFONSO-CARDOSO, S. R. et al. Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection in murine macrophages. **Exp Parasitol**, v. 128, n. 1, p. 61-7, May 2011.

ALBUQUERQUE, D. A. et al. The adjuvant effect of jacalin on the mouse humoral immune response to trinitrophenyl and *Trypanosoma cruzi*. **Immunol Lett**, v. 68, n. 2-3, p. 375-81, Jun 1 1999.

ANDREWS, K. T.; FISHER, G.; SKINNER-ADAMS, T. S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**, v. 4, n. 2, p. 95-111, Aug 2014.

BARBOSA, B. F. et al. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, v. 28, n. 7, p. 624-30, Jul 2007.

BOOTHROYD, J. C.; DUBREMETZ, J. F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 1, p. 79-88, Jan 2008.

BOSCH-DRIESSEN, L. H. et al. A prospective, randomized trial of pyrimethamine and azithromycin vs pyrimethamine and sulfadiazine for the treatment of ocular toxoplasmosis. **Am J Ophthalmol**, v. 134, n. 1, p. 34-40, Jul 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRADLEY, P. J.; SIBLEY, L. D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 6, p. 582-7, Dec 2007.

BUNN-MORENO, M. M.; CAMPOS-NETO, A. Lectin(s) extracted from seeds of *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B cell functions. **J Immunol**, v. 127, n. 2, p. 427-9, Aug 1981.

CARDOSO, M. R. et al. Adjuvant and immunostimulatory effects of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex (ScLL) in the mouse model of vaccination against neosporosis. **Vet Res**, v. 43, p. 76, 2012.

CARDOSO, M. R. et al. ArtinM, a D-mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against *Neospora caninum*. **Vaccine**, v. 29, n. 49, p. 9183-93, Nov 15 2011.

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Curr Opin Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 83-9, Feb 2007.

CARRUTHERS, V. B. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. **Parasitol Int**, v. 48, n. 1, p. 1-10, Mar 1999.

_____. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Trop**, v. 81, n. 2, p. 111-22, Feb 2002.

CARRUTHERS, V. B.; TOMLEY, F. M. Microneme proteins in apicomplexans. **Subcell Biochem**, v. 47, p. 33-45, 2008.

CAVADA, B. S. et al. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Curr Protein Pept Sci**, v. 2, n. 2, p. 123-35, Jun 2001.

CHATTERJEE, B. et al. Comparative studies of new marker lectins for alkali-labile and alkali-stable carbohydrate chains in glycoproteins. **Int J Biochem**, v. 10, n. 4, p. 321-7, 1979.

CHENE, G.; THIEBAUT, R. Options for clinical trials of pre and post-natal treatments for congenital toxoplasmosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 299-304, Mar 2009.

COLTRI, K. C. et al. Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. **Med Mycol**, v. 48, n. 6, p. 792-9, Sep 2010.

DE SOUZA, W. Fine structure of the conoid of *Toxoplasma gondii*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 16, n. 1, p. 32-8, Jan 1974.

DIAS, R. O. et al. Insights into Animal and Plant Lectins with Antimicrobial Activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 519-541, 2015.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **J Am Vet Med Assoc**, v. 189, n. 2, p. 166-70, Jul 15 1986.

_____. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. **Vet Parasitol**, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, Dec 9 2004.

_____. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 8, p. 877-82, Jul 1 2009.

DUBEY, J. P. et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375-424, Sep 2012.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 2, p. 267-99, Apr 1998.

DUBEY, J. P. et al. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **J Parasitol**, v. 83, n. 5, p. 870-82, Oct 1997.

DUNAY, I. R.; SIBLEY, L. D. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. **Curr Opin Immunol**, v. 22, n. 4, p. 461-6, Aug 2010.

DUNCAN, M. W. A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. **Amino Acids**, v. 25, n. 3-4, p. 351-61, Dec 2003.

DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 6, p. 793-813, Nov 2012.

EDVINSSON, B. et al. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. **Clin Microbiol Infect**, v. 12, n. 2, p. 131-6, Feb 2006.

FOX, B. A.; GIGLEY, J. P.; BZIK, D. J. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 3, p. 323-31, Mar 9 2004.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, n. 3919, p. 893-6, Feb 6 1970.

GAZZINELLI, R. T. et al. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ and TNF- α . **J Immunol**, v. 157, n. 2, p. 798-805, Jul 15 1996.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, n. 1, p. 131-8, Oct 1982.

GUBBELS, M. J.; DURAISINGH, M. T. Evolution of apicomplexan secretory organelles. **Int J Parasitol**, v. 42, n. 12, p. 1071-81, Nov 2012.

HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 11, p. 766-78, Nov 2012.

INGALE, A. G.; HIVRALE, A. U. Plant as a plenteous reserve of lectin. **Plant Signal Behav**, v. 8, n. 12, p. e26595, 2013.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **J Immunol Methods**, v. 212, n. 2, p. 193-211, Mar 15 1998.

KASPER, L. H.; MINEO, J. R. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Today**, v. 10, n. 5, p. 184-8, May 1994.

KHAN, I. A. et al. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 25, p. 13955-60, Dec 9 1997.

KIM, Y. J. et al. Topical application of the lectin Artin M accelerates wound healing in rat oral mucosa by enhancing TGF-beta and VEGF production. **Wound Repair Regen**, v. 21, n. 3, p. 456-63, May-Jun 2013.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 485-517, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.

LANG, C.; GROSS, U.; LUDER, C. G. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Res**, v. 100, n. 2, p. 191-203, Jan 2007.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Front Plant Sci**, v. 5, p. 397, 2014.

LIN, M. H. et al. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 11, p. 4121-5, Nov 2000.

LUFT, B. J. et al. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. **JAMA**, v. 252, n. 7, p. 913-7, Aug 17 1984.

MACHADO, A. S. et al. Biomarker analysis revealed distinct profiles of innate and adaptive immunity in infants with ocular lesions of congenital toxoplasmosis. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 910621, 2014.

MARIANO, V. S. et al. Recognition of TLR2 N-glycans: critical role in ArtinM immunomodulatory activity. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e98512, 2014.

MARIM, F. M. et al. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15263, 2010.

MESQUITA JUNIOR, D. et al. Immune system - part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 5, p. 552-80, Sep-Oct 2010.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 3, p. 1215, Feb 11 1988.

MINEO, J. R. et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. **J Immunol**, v. 150, n. 9, p. 3951-64, May 1 1993.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

PADRAO JDA, C. et al. *Toxoplasma gondii* infection of activated J774-A1 macrophages causes inducible nitric oxide synthase degradation by the proteasome pathway. **Parasitol Int**, v. 63, n. 5, p. 659-63, Oct 2014.

PANUNTO-CASTELO, A. et al. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, v. 11, n. 12, p. 1035-42, Dec 2001.

PEREIRA-DA-SILVA, G.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; VAN DAMME, E. J. Artin M: a rational substitution for the names artocarpin and KM+. **Immunol Lett**, v. 119, n. 1-2, p. 114-5, Aug 15 2008.

PLEYER, U.; SCHLUTER, D.; MANZ, M. Ocular toxoplasmosis: recent aspects of pathophysiology and clinical implications. **Ophthalmic Res**, v. 52, n. 3, p. 116-23, 2014.

PRANCHEVICIUS, M. C. et al. Characterization and optimization of ArtinM lectin expression in *Escherichia coli*. **BMC Biotechnol**, v. 12, p. 44, 2012.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, n. 2, p. 264-96, Apr 2012.

ROGERIO, A. P. et al. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology**, v. 17, n. 8, p. 795-804, Aug 2007.

ROQUE-BARREIRA, M. C. et al. IgA-affinity purification and characterization of the lectin jacalin. **Braz J Med Biol Res**, v. 19, n. 2, p. 149-57, 1986.

SANECKA, A.; FRICKEL, E. M. Use and abuse of dendritic cells by *Toxoplasma gondii*. **Virulence**, v. 3, n. 7, p. 678-689, Nov 2012.

SANTOS-DE-OLIVEIRA, R. et al. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **J Immunol**, v. 153, n. 4, p. 1798-807, Aug 15 1994.

SCHARTON-KERSTEN, T. M. et al. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. **J Immunol**, v. 157, n. 9, p. 4045-54, Nov 1 1996.

SCHLUTER, D. et al. Animals are key to human toxoplasmosis. **Int J Med Microbiol**, v. 304, n. 7, p. 917-29, Oct 2014.

SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R. A. *Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages. **Exp Parasitol**, v. 100, n. 1, p. 62-70, Jan 2002.

SEPULVEDA-ARIAS, J. C.; VELOZA, L. A.; MANTILLA-MURIEL, L. E. Anti-Toxoplasma Activity of Natural Products: A Review. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, Apr 10 2015.

SIBLEY, L. D. Intracellular parasite invasion strategies. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 248-53, Apr 9 2004.

_____. How apicomplexan parasites move in and out of cells. **Curr Opin Biotechnol**, v. 21, n. 5, p. 592-8, Oct 2010.

SOUZA, M. A. et al. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconj J**, v. 30, n. 7, p. 641-57, Oct 2013.

STOCKERT, R. J.; MORELL, A. G.; SCHEINBERG, I. H. Mammalian hepatic lectin. **Science**, v. 186, n. 4161, p. 365-6, Oct 25 1974.

SUZUKI, Y. et al. Interferon-gamma- and perforin-mediated immune responses for resistance against *Toxoplasma gondii* in the brain. **Expert Rev Mol Med**, v. 13, p. e31, 2011.

TANG, Q. et al. Calcium-dependent phosphorylation alters class XIVa myosin function in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Mol Biol Cell**, v. 25, n. 17, p. 2579-91, Sep 1 2014.

TEIXEIRA, C. R. et al. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 3001-8, Apr 5 2006.

TOLEDO, K. A. et al. Neutrophil activation induced by ArtinM: release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. **Immunol Lett**, v. 123, n. 1, p. 14-20, Mar 24 2009.

VAN DAMME, E. J. History of plant lectin research. **Methods Mol Biol**, v. 1200, p. 3-13, 2014.

VASTA, G. R. Roles of galectins in infection. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 6, p. 424-38, Jun 2009.

WILHELM, C. L.; YAROVINSKY, F. Apicomplexan infections in the gut. **Parasite Immunol**, v. 36, n. 9, p. 409-20, Sep 2014.

WOODS, S. et al. MAP kinase phosphatase-2 plays a key role in the control of infection with *Toxoplasma gondii* by modulating iNOS and arginase-1 activities in mice. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 8, p. e1003535, Aug 2013.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 2, p. 109-21, Feb 2014.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 058/14, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Efeito imunomodulatório da lectina de *Synadenium carinatum* (ScLL) na resposta imune inata e adaptativa em modelo *in vitro* e *in vivo* contra *Toxoplasma gondii*", sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Roberto Mineo** está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de **10 de outubro de 2014**.

(We certify that the protocol nº 058/14, about "Efeito imunomodulatório da lectina de *Synadenium carinatum* (ScLL) na resposta imune inata e adaptativa em modelo *in vitro* e *in vivo* contra *Toxoplasma gondii*", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 10/10/2014).

Uberlândia, 13 de outubro de 2014.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU