

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

**EFEITO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DA PLANTA *Annona muricata* L.
(GRAVIOLA) E SUAS FRAÇÕES NO CONTROLE DA INFECÇÃO *IN VITRO* E
IN VIVO POR *Toxoplasma gondii*.**

Natália Carnevalli de Miranda

Uberlândia, Julho – 2018



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



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Natália Carnevalli de Miranda

“Efeito do extrato bruto etanólico da planta *Annona muricata* (graviola) e suas frações no controle da infecção *in vitro* e *in vivo* por *Toxoplasma gondii*”


Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.


Banca Examinadora:


Uberlândia, 23 de julho de 2018.


Prof. Dra. Neire Moura de Gouveia
MORGANA POTRICH


Prof. Dr. Fernando dos Reis de Carvalho
IFG


Prof. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa
ICBIM/UFU


Prof. Dr. José Roberto Mineo
ICBIM/UFU


Prof. Dra. Neide Maria da Silva – orientadora
ICBIM/UFU

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

M672e 2018 Miranda, Natália Carnevalli de, 1983
Efeito do extrato bruto etanólico da planta *Annona muricata* L. (Graviola) e suas frações no controle da infecção in vitro e in vivo por *Toxoplasma gondii* [recurso eletrônico] / Natália Carnevalli de Miranda. - 2018.

Orientadora: Neide Maria da Silva.

Coorientadora: Foued Salmen Espindola.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1209>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. *Toxoplasma gondii*. 3. Citocinas. 4. Lipídios. I. Silva, Neide Maria da, 1961, (Orient.). II. Espindola, Foued Salmen, 1957, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais por toda a dedicação, apoio e incentivo para que prosseguisse meus estudos e assim aprofundar meus conhecimentos e práticas. Além de serem cidadãos, professores e principalmente pais exemplares, no qual eu me inspiro e orgulho muito em ser filha!

“Foi assim que Deus manifestou o seu amor entre nós: enviou o seu Filho Unigênito ao mundo, para que pudéssemos viver por meio dele. Nisto consiste o amor: não em que nós tenhamos amado a Deus, mas em que ele nos amou e enviou seu Filho como propiciação pelos nossos pecados. Amados, visto que Deus assim nos amou, nós também devemos amar uns aos outros (1 João 4:9-11).”

AGRADECIMENTOS

Deus por seu amor, pelo milagre da vida, pela maravilhosa natureza, por nos mostrar que o amor é sempre o melhor caminho e crer que nos momentos difíceis Ele está ao nosso lado, nos fortalecendo e fazendo crer sempre no melhor.

*Meus pais **Antônio Carlos Carneiro De Miranda e Maria Anita Carnevalli De Miranda**, por seus ensinamentos e exemplo que me fizeram ser a pessoa que sou hoje. Por sempre dedicarem suas vidas para seus filhos e netos. Pessoas honradas, respeitadas, moral que ninguém contesta. Meus exemplos em todas as áreas da vida, como pessoas, como casal, como pais, amigos e profissionais! São e sempre serão meus estímulos, minhas referências, minhas fontes de amor, sabedoria e conselhos. **AMO MUITO VCS!***

*Meus irmãos **Frederico Carnevalli De Miranda e Patrícia De Miranda Emrick**, por toda amizade, conselhos e também as brigas (faz parte!). Somos três personalidades bastante diferentes, mas admiro cada um de vocês da forma que são. Patrícia sempre muito comunicativa (puxou o vovô Ico e a mamãe) e amiga. Tornou-se uma mãe que me inspira e também uma profissional dedicada. Frederico, sempre muito focado e dedicado em seus objetivos e planos, me ensinando que nunca é tarde demais para fazer o que realmente se gosta. Ótimo em conselhos financeiros me ajudando a ser uma pessoa mais equilibrada financeiramente e sempre poupar e pensar no futuro.*

*Meus três amarecos: **Bebel (Izabel Sofia De Miranda Emrick)**, **Gigi (Gisele Gabriela De Miranda Emrick)** e **Huguinho (Hugo César De Miranda Emrick)**. Titia/Madrinha ama muito vocês e morre de saudades de ter vocês perto de mim, mas sei que essa é o destino e a vida de vocês e que com toda certeza será maravilhoso para o futuro de vocês! Que Deus os abençoe e ilumine sempre para seguirem o bom caminho! Titia/Madrinha **AMA MUITO!!!***

*Meus quatro avôs (in memoriam): **Americo (Vovô Ico)**, **Maria Imaculada (Vovó Iaia)**, **Hermengarda e José Carneiro**. Deus já os chamou para perto de si e a saudade é imensa! Com toda certeza também foram essenciais na minha vida e na minha formação! Espero que sintam o amor e carinho que tenho por cada um!*

*Meu namorado **Adriano De Almeida Prado**, quem nos conhece e conhece a nossa história sabe que meu sentimento por você é praticamente de uma vida inteira! Somos muito diferentes na criação, em como encarar o mundo e planos de vida, mas o nosso afeto faz com que conseguimos driblar e mantermos unidos e permanecermos juntos! Admiro muito sua disponibilidade em ajudar as pessoas. Na sua inteligência e facilidade de aprendizado e principalmente, na sua dedicação e perfeccionismo em realizar suas tarefas/trabalho. **TE AMO!***

*Minhas amigas da Escola Estadual Messias Pedreiro **Angélica, Daniela, Flávia Araújo, Flávia Franco, Larissa, Lyvia e Moira**. Amigas irmãs, que tenho um carinho enorme! Amigas, mães e profissionais dedicadas! Amo vocês meninas!*

*Amigas da minha querida 61ª Medicina Veterinária - UFU para a vida! **Fernanda e Andressa**, minhas panteras queridas! Amo vocês e saibam que desejo o melhor para a vida de cada uma!*

Aos amigos que adquiri nessa vida de pós-graduação: do LABIBI pela convivência na época do mestrado e especialmente ao Prof. Foued Salmen Espindola por continuar sua orientação, como meu coorientador do doutorado e ao Allisson por ser seu auxílio nas dúvidas durante as preparações dos extratos.

*Aos amigos do IMPAT e do laboratório de histologia da UFU (**Ana, Angelo, Carlos, Camila, Ester, Fabrício, Jucelia, Layane, Loyane, Mayara, Marcos Paulo, Mariane, Mário, Marisol, Nathalia, Rômulo, Rosiane e Yusmaris**). Como vocês foram essenciais nesses 4 anos!!! Senão fosse a amizade e convivência no dia-a-dia, os dias teriam sido muito mais difíceis e pesados! Nossas conversas e risadas fizeram meus dias mais alegres e leves, me fortaleceram para encarar e superar as dificuldades que todos sabemos que surgem nessa caminhada. Desejo que Deus olhe para a vida de cada um e que seus sonhos e desejos se realizem!!! Muito queridos em minha vida!! Espero que nossa amizade continue e perdure, mas a vida às vezes não nos permite continuarmos, mas saibam que sempre terão um cantinho especial em meu coração e boas lembranças em minha memória!*

*A toda equipe responsável pela limpeza das instalações da UFU, principalmente as que realizam a limpeza do Bloco 2B, que foram as que eu mantive maior contato durante esse tempo, infelizmente não me lembro do nome de todas, mas coloco Dona **Vitória** como representante de todas. Meu **MUITO OBRIGADO** por dedicar suas vidas realizando um trabalho tão essencial e importante para a preservação de nossa saúde, bem-estar e conforto de todos!*

Ao programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada, pelo suporte e apoio dado para os discentes e docentes.

Aos programas de financiamento a pesquisa, CNPq, FAPEMIG e CAPES, principalmente a CAPES por ter financiado minha bolsa de estudo, meu salário, para que assim eu pudesse me dedicar de corpo e alma ao meu trabalho. E espero retribuir da melhor maneira o investimento realizado durante esses 4 anos.

*E por fim e nada menos importante, porque sabemos que o último nome nos artigos, é o nome do responsável pelo desenvolvimento do trabalho, o orientador. **Profa. Neide Maria Da Silva**, eu agradeço muito a oportunidade concedida, me aceitando ser minha orientadora no doutorado e acreditando no desenvolvimento do nosso trabalho. Agradeço ao conhecimento e prática adquirida todos esses anos! Admiro muito a profissional competente que é! Tenho como exemplo de professora e principalmente como pesquisadora, muito dedicada! Que Deus a abençoe e que continue conquistando muitos frutos, através de muitos artigos publicados!*

RESUMO

Toxoplasma gondii é um dos parasitas mais bem sucedidos do mundo, infectando uma grande variedade de mamíferos, incluindo um terço da população humana global. Extratos de várias partes morfológicas de *Annona muricata* L. (Annonaceae) são amplamente utilizados medicinalmente em muitas partes do mundo para o manejo, controle e/ou tratamento de várias doenças humanas. Neste contexto, investigamos a ação do extrato etanólico da *A. muricata* L. (EtOHAm) durante a infecção por *T. gondii* *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, fibroblastos NIH/3T3 e macrófagos J774 foram infectados e tratados com diferentes concentrações de EtOHAm e suas frações hexano (HexAm), diclorometano (CH₂Cl₂Am) e acetato de etila (EtOAcAm), e o parasitismo e a produção de óxido nítrico (NO) foram analisados. Para o estudo *in vivo*, camundongos C57BL/6 foram infectados com *T. gondii* e tratados com os extratos e analisados para parasitismo, histologia, parâmetros bioquímicos e imunológicos. O tratamento com EtOHAm foi capaz de controlar o parasitismo em fibroblastos e macrófagos e, adicionalmente, aumentou a produção de NO pelas células hematopoiéticas; e as frações HexAm, CH₂Cl₂Am e EtOAcAm controlaram o crescimento parasitário nas concentrações de 20 ou 50, 50 e 200 µg/mL, respectivamente. *In vivo*, o tratamento com EtOHAm prolongou a sobrevivência, controlou a proliferação do parasita no intestino delgado e no pulmão no dia 8 pós-infecção (p.i.) e no cérebro no dia 30 p.i., mas o mesmo não foi observado para as frações. O baixo parasitismo em camundongos tratados com EtOHAm foi associado com níveis moderados de IFN-γ e TNF, aumento do número de células calciformes no intestino delgado e diminuição dos níveis dos lipídios triglicérides e VLDL sistemicamente. Portanto, o EtOHAm pode ser um bom candidato para o tratamento da toxoplasmose.

Palavras-chave: Filo Apicomplexa, resposta imunológica, óxido nítrico, citocinas, lipídios.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is one of the most successful parasites in the world, infecting a wide variety of mammals, including a third of the global human population. Extracts from various morphological parts of *Annona muricata* L. (Annonaceae) are widely used medicinally in many parts of the world for the management, control and/or treatment of several human diseases. In this context, we investigated the action of ethanolic extract of *A. muricata* L (EtOHAm) treatment during *T. gondii*-infection *in vitro* and *in vivo*. For *in vitro*, NIH/3T3 fibroblast and J774 macrophages cell lines were infected and treated with different concentrations of EtOHAm, and hexane (HexAm), dichloromethane (CH₂Cl₂Am) and ethyl acetate (EtOAcAm) fractions, and the parasitism and nitric oxide (NO) production were analyzed. For *in vivo* experiments, C57BL/6 mice were infected with *T. gondii* and treated as described above, and analyzed for parasitism, histology, biochemical and immunological parameters. The EtOHAm-treatment was able to control the parasitism in fibroblasts and macrophages, and additionally, increased the NO production by the hematopoietic cells; and HexAm, CH₂Cl₂Am and EtOAcAm fractions controlled parasite grow at 20 or 50, 50 and 200 μ g/mL concentrations, respectively. *In vivo*, the EtOHAm -treatment prolonged the survival, controlled the parasite proliferation in the small intestine and lung on day 8 post-infection (p.i.) and in the brain on day 30 p.i., but not the fractions. The lower parasitism in EtOHAm-treated mice was associated with IFN- γ and TNF moderated levels, increased goblet cell numbers in the small intestine and decreased triglycerides and VLDL lipid levels systemically. Therefore, EtOHAm could be a good candidate for toxoplasmosis treatment.

Keywords: Phylum Apicomplexa, immune response, nitric oxide, cytokines, lipids.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- ABC** - complexo avidina biotina
- ATCC** - American Type Culture Collection
- BuOH** - fração n-butanol da *Annona muricata*
- CBEA** - Centro de Bioterismo e Experimentação Animal
- CEUA** - Comitê de Ética na Utilização Animal
- CH₂Cl₂Am** - fração diclorometano da *Annona muricata*
- COX 1 e 2** - ciclo-oxigenase 1 e 2
- CPRG** - chlorophenol red-β-d-galactopyranoside
- DAB** - diaminobenzidina
- DMSO** - dimetilsufóxido
- DMEM** - meio de Eagle modificado por Dulbecco
- DMF** - N-N-dimetil-formamida
- ELISA** - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
- EtOAcAm** - fração acetato de etila da *Annona muricata*
- EtOHAm** - extrato bruto etanólico da *Annona muricata*
- H₂O** - água
- H₂OAm** - fração aquosa da *Annona muricata*
- H₂O₂** - peróxido de hidrogênio
- HDL-c** - lipoproteína de alta densidade
- HE** - Hematoxilina de Harris
- HexAm** - fração hexano da *Annona muricata*
- IFN-γ** - interferon-γ
- IgA** - imunoglobulina A
- IH** - imunohistoquímica
- IL-4** - interleucina 4
- IL-10** - interleucina 10
- IL-12** - interleucina 12
- iNOS** - óxido nítrico sintetase induzível
- LDL-c** - lipoproteína de baixa densidade
- MTT** - 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo
- NO** - óxido nítrico
- PBS** - salina tamponada com fosfato

p.i - pós-infecção

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

ROS - espécies reativas de oxigênio

SDS - duodecil sulfato de sódio

SFB - soro fetal bovino

TGF- β - fator transformador de crescimento β

TGP - transaminase glutâmico pirúvica ou alanina aminotransferase

TNF - fator de necrose tumoral

VLDL-c - lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Annona muricata</i> (AM - graviola).....	21
Figura 2. Desenho experimental.....	32
Figura 3. Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos NIH/3T3 tratados com extrato bruto etanólico da <i>Annona muricata</i> (AM) e suas frações	37
Figura 4. Proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> nos macrófagos J774 e fibroblastos NIH/3T3 tratados com extrato bruto da <i>Annona muricata</i> (AM).....	38
Figura 5. Proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> nos fibroblastos NIH/3T3 tratados com as frações da <i>Annona muricata</i> (AM).....	39
Figura 6. Determinação dos níveis de nitrito em macrófagos murinos J774 estimulados com extrato etanólico da <i>Annona muricata</i> (AM) e infectados com <i>T. gondii</i>	40
Figure 7. Variação do peso corporal (%), escore de morbidade e curva de sobrevivência de camundongos infectados com <i>T. gondii</i> e tratados com extrato da <i>Annona muricata</i> (AM) e suas frações.....	41
Figura 8. Quantificação de <i>T. gondii</i> nos tecidos de camundongos infectados e tratados com extrato da <i>Annona muricata</i> (AM) e suas frações.....	44
Figure 9. Quantificação das células Caliciformes e de Paneth no tecido intestinal de camundongos infectados com <i>T. gondii</i> e tratados com os extratos da <i>Annona muricata</i> (AM) e suas frações.....	45
Figura 10. Análises da patologia dos tecidos hepático e pulmonar dos animais infectados por <i>T. gondii</i> e tratados com extrato da <i>Annona muricata</i> (AM) e suas frações.....	47
Figura 11. Mensuração da enzima transaminase pirúvica (TGP) no soro de animais após 8 e 30 dias de infecção por <i>T. gondii</i> e tratados com extrato da <i>Annona muricata</i> (AM) e suas frações.....	48
Figura 12. Perfil de citocinas mensurado no soro de animais infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> tratados com extrato bruto da <i>Annona muricata</i> (AM).....	49
Figura 13. Perfil lipídico mensurado no soro de animais após 8 dias de infecção por <i>T. gondii</i> e tratados com extrato da <i>Annona muricata</i> (AM) e suas frações.....	52
Figura 14. Perfil lipídico mensurado no soro de animais após 30 dias de infecção por <i>T. gondii</i> e tratados com extrato da <i>Annona muricata</i> (AM).....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	14
1.1.1 Formas infectantes e ciclo biológico.....	14
1.1.2 Toxoplasmose.....	16
1.2 Resposta imune a <i>T. gondii</i>	18
1.3 Medicamentos que inibem <i>T. gondii</i>	19
1.4 <i>Annona muricata</i> Linn (Graviola).....	21
1.4.1 Características botânicas e distribuição.....	21
1.4.2 Utilização etnomedicinal e atividade biológica	22
1.4.2.1 Atividade anticâncer.....	22
1.4.2.2 Atividade antioxidante.....	23
1.4.2.3 Atividade anti-inflamatória e antinociceptivo.....	24
1.4.2.4 Atividade antiparasitária.....	24
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Material vegetal, extração etanólica e particionamento líquido-líquido.....	28
4.2 Cultura de células e parasitas.....	28
4.3 Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos NIH/3T3 tratados com EtOHAm e suas frações.....	29
4.4 Quantificação da proliferação intracelular de parasitas.....	30
4.5 Determinação dos níveis de nitrito em sobrenadantes de macrófagos J774 tratados com EtOHAm, LPS ou IFN- γ e infectados ou não com <i>T. gondii</i>	30
4.6 Animais e grupos experimentais.....	31
4.7 Tratamentos e infecção por <i>T. gondii</i>	32
4.8 Análise histológica.....	33
4.9 Imunohistoquímica para detecção e quantificação de <i>T. gondii</i>	34
4.10 Análise do Perfil de Citocinas (IL-10, IFN- γ , TGF- β e TNF) no soro dos camundongos infectados.....	34

4.11 Dosagem sérica de transaminase glutâmico-pirúvica (TGP).....	35
4.12 Análise de Perfil Lipídico (Colesterol total, Triglicerídeos, HDL-c, LDL-c, VLDL).....	35
4.13 Análise estatística.....	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Viabilidade celular de Fibroblastos NIH/3T3 tratados com EtOHAm e suas frações.....	36
5.2 EtOHAm bruto apresenta ação anti- <i>T. gondii</i>	37
5.3 EtOHAm aumenta os níveis de NO em células J774 infectadas com <i>T. gondii</i>	39
5.4 O tratamento com EtOHAm influencia nos parâmetros clínicos de camundongos C57BL/6 infectados.....	40
5.5 EtOHAm apresenta atividade antiparasitária em camundongos infectados.....	42
5.6 EtOHAm preserva células calciformes no intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados com <i>T. gondii</i>	44
5.7 Mensuração de TGP no soro de animais infectados com <i>T. gondii</i> e tratados com EtOHAm e frações.....	46
5.8 O tratamento de camundongos com EtOHAm interfere nos níveis séricos de citocinas no soro de camundongos infectados com <i>T. gondii</i>	48
5.9 O tratamento com EtOHAm influencia o perfil sérico de lipídios de camundongos infectados com <i>T. gondii</i>	50
6. DISCUSSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS.....	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é o agente causador da toxoplasmose, um parasito intracelular obrigatório, comum em todos os animais de sangue quente, inclusive os humanos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Para invadir as células do hospedeiro, *T. gondii* utiliza um processo ativo, complexo que depende de uma variedade de atividades e regulações (mobilidade do parasito e secreções de proteínas por suas organelas) (BLADER; SAEIJ, 2009; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

A maior prevalência do parasito está nos países da América Latina e nos países africanos tropicais (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). No Brasil, grande parte da população adulta (50-80%) é soropositiva para a infecção por *T. gondii*. A principal causa da maior prevalência em países tropicais é devido ao clima quente e úmido destes locais, o que é um fator essencial para a sobrevivência do oocisto no ambiente. Outros fatores importantes são os antropológicos, como o hábito alimentar, higiênico, econômico, social (qualidade da água e saneamento básico) e cultural (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

1.1.1 Formas infectantes e ciclo biológico

T. gondii apresenta um ciclo de vida heteroxênico, sendo os hospedeiros definitivos (nos quais ocorre tanto a reprodução sexuada quanto assexuada) os felídeos e hospedeiros intermediários (nos quais ocorre a reprodução assexuada) os animais de sangue quente (mamíferos e aves). O parasito apresenta três formas infectantes: taquizoítos, bradizoítos e oocistos (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

A principal via de transmissão é a oral, por meio da ingestão dos oocistos esporulados do meio ambiente (solo, água ou alimentos), ingestão de cistos teciduais em vísceras, carne crua ou mal cozida de hospedeiro intermediário e também pela ingestão de leite materno infectado. Além disso, a transmissão vertical (transmissão transplacentária de taquizoítos) também pode ocorrer (CARRUTHERS; SUZUKI, 2007; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). O taquizoíto é a forma de disseminação do parasito (grego: *tachis* = rápido), seu tamanho é de 2 - 4 µm de largura e 4 - 8 µm de comprimento. Essa forma infectante é capaz

de invadir todo tipo de célula por penetração ativa, multiplicando dentro do vacúolo parasitóforo. Depois de repetidas replicações, ocorre o rompimento da célula do hospedeiro, liberando os taquizoítos que serão disseminados pela corrente sanguínea, infectando todo o organismo. A infecção por *T. gondii* desencadeia uma intensa resposta inflamatória, levando a destruição tecidual característica das manifestações clínicas da doença. Em decorrência da pressão da resposta imune do hospedeiro, os taquizoítos podem se converter em bradizoítos (DUBEY, 1998; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Os bradizoítos são a forma de divisão lenta dos parasitos (grego: *brady* = lento) e estão contidos dentro de cistos teciduais, que variam em tamanho de 5 – 70 μm , e estão presentes na infecção crônica. Sua forma é similar aos taquizoítos, entretanto expressam moléculas específicas do estágio com funções diferentes. Os cistos teciduais normalmente se encontram dentro das células hospedeiras do tecido muscular cardíaco ou esquelético e cerebral. Os bradizoítos podem ser liberados dos cistos e se diferenciarem novamente em taquizoítos, causando o reaparecimento da infecção em pacientes imunocomprometidos (DUBEY, 1998; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

O felino ingere o cisto tecidual de um hospedeiro intermediário e a parede do cisto é destruída por enzimas gástricas. Os bradizoítos infectam os enterócitos, onde começam a multiplicação assexuada (endodiogenia), caracterizada pelo desenvolvimento de merozoítos dentro dos esquizontes (DUBEY, 1998). Esse processo dá origem aos gametas femininos e masculinos (gametogonia) no epitélio do intestino delgado. Após a fertilização, os oocistos formados dentro dos enterócitos são liberados para o lúmen intestinal devido ao rompimento das células e excretados para o ambiente na forma não esporulada (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

A esporogonia ocorre após alguns dias no meio externo, levando a formação do oocisto esporulado com dois esporocistos contendo quatro esporozoítos haplóides. As condições ideais para que ocorra é a temperatura de 20°C e umidade de 65% (LINDSAY et al., 1997). Esses podem infectar outros hospedeiros intermediários ou definitivos quando ingeridos juntos aos alimentos ou água (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

No hospedeiro intermediário, o parasito apresenta duas fases em seu desenvolvimento assexuado. Na primeira fase, após a ingestão do oocisto, esporozoítos são liberados, penetram no epitélio intestinal diferenciando-se em taquizoítos que replicam rapidamente por endodiogenia dentro de qualquer tipo celular e disseminam por todo o organismo. A segunda fase começa quando taquizoítos iniciam a conversão para bradizoítos (cisto tecidual) ocorrendo a partir de 7 – 10 dias após a infecção. Dentro do cisto tecidual, bradizoítos se

multiplicam por endodiogenia, e apresentam alta afinidade por tecido muscular e cerebral, contudo, pode ser encontrado em vísceras, tais como pulmão, fígado e rins (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). O cisto tecidual pode permanecer durante toda a vida na maioria dos hospedeiros (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Após a ingestão destes cistos teciduais por um hospedeiro intermediário através de carne crua ou mal cozida, os cistos são rompidos e passam pelo trato digestivo causando liberação de bradizoítos. Estes irão infectar o epitélio intestinal do novo hospedeiro podendo diferenciar em taquizoítos, disseminando para todo o organismo (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

1.1.2 Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma doença infecciosa causada pelo parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

As principais formas de infecção para os humanos são resultantes da ingestão ou manipulação de carne crua ou mal cozida, contendo cistos do parasito, assim como o consumo de água ou alimentos contaminados com oocistos eliminados nas fezes de felinos infectados (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; TORGERSON; MASTROIACOVO, 2013). Contudo, os oocistos são eliminados na forma não esporulada no ambiente, portanto, não infectantes, assim, o contato com fezes frescas (fezes de um dia) não representa risco de adquirir a doença (BROWN et al., 2005). Gatos mantidos dentro de casa, que não praticam a caça e não se alimentam de carne crua, estão menos propensos de adquirir infecção por *T. gondii*. Os gatos de maior risco são os errantes ou com hábito de sair de casa, pois podem defecar em jardins ou em caixas de areia presentes por onde passam, podendo assim, determinar risco de infecção para qualquer indivíduo: sejam proprietários de gatos ou não (JONES et al., 2001).

Os sintomas da infecção que poderão surgir são semelhantes aos da gripe, como dores musculares, fadiga, febre, assim como gânglios cervicais inchados e dor de cabeça, porém, 90% das pessoas são assintomáticas. Contudo, pessoas imunossuprimidas ou crianças que adquirem a doença congenitamente, podem apresentar complicações mais sérias.

A toxoplasmose congênita ocorre pela transmissão via materno-fetal, sendo uma das maiores preocupações de saúde pública, já que a gestante infectada geralmente é assintomática, porém, para o feto pode se tornar maléfico, com possibilidade de morte e aborto. Se a gestação prosseguir, o feto pode apresentar déficits neurológicos, neurocognitivos e problemas oculares, como a coriorretinite (JONES et al., 2001).

Durante a gestação, o diagnóstico da infecção é realizado por meio da verificação da presença de anticorpos específicos no soro (SABIN; FELDMAN, 1948). Com relação ao tratamento, medicamentos com efeito antiparasitário, tais como espiramicina é usada isoladamente ou, dependendo da fase gestacional, associada à sulfadiazina e pirimetamina (ASSOLINI et al., 2017). Estes são oferecidos às mulheres gestantes para prevenir a transmissão para o feto e reduzir sequelas (ESKILD et al., 1996).

A toxoplasmose ocular é uma das formas mais frequentes, causadora de uveíte pós-infecção (MAENZ et al., 2014). Geralmente seu diagnóstico é realizado com base em sintomas clínicos típicos de retinocoroidite necrosante, cicatriz retinocoroidiana (MAENZ et al., 2014), neurorretinite (KÜÇÜKERDÖNMEZ; AKOVA; YILMAZ, 2002), uveítes intermediárias (BASU et al., 2010; HOLLAND et al., 1999), além de testes sorológicos e respostas ao tratamento podem fornecer informações suplementares.

Uma das consequências da toxoplasmose congênita é a toxoplasmose ocular no feto, portanto, sua incidência continua a ser subestimada em relação às sequelas oculares significativas (TORGERSON; MASTROIACOVO, 2013). A infecção não congênita é considerada a apresentação mais frequente da toxoplasmose ocular, contudo, muitas vezes é difícil distinguir entre as manifestações da doença, com base apenas nas características clínicas (MAENZ et al., 2014). Entretanto, existem algumas características clínicas que podem ajudar nesta distinção, por exemplo, tem sido sugerido que uma característica comum da infecção congênita é o envolvimento bilateral, com posterior surgimento de cegueira, enquanto que a infecção não congênita se apresenta mais frequentemente unilateralmente (BOSCH-DRIESSEN, 2002).

Como medida de controle da toxoplasmose em seres humanos e animais, são necessárias medidas de saúde pública, entretanto, a eficácia de tais medidas ainda não é suficiente para prevenir a infecção congênita (ESKILD et al., 1996). A triagem neonatal é uma forma de controle sobre os dados epidemiológicos do país, como por exemplo, a Dinamarca e EUA, onde 80% dos recém-nascidos infectados foram identificados (GUERINA; HSU, 1994; KIMBALL; KEAN; , 1971; LEBECH et al., 1999; PETERSEN; EATON, 1999).

Outra forma de controle da toxoplasmose seria a utilização de vacinas. Observou-se que em camundongos, a imunização com rTgHSP70 induziu a expressão maciça de iNOS e reduziu o parasitismo cerebral, sugerindo ser um bom candidato para o desenvolvimento de vacinas contra toxoplasmose (CZARNEWSKI et al., 2017). Na Europa e Nova Zelândia apenas a Estirpe S48 (atenuado) do parasito foi licenciada para uso em ovinos. As pesquisas com vacinas estão com foco para produzirem proteção e resposta humoral, incluindo IgA,

desejando assim mimetizar a imunidade conferida pela infecção natural (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

1.2 Resposta imune a *T. gondii*

O sistema imune apresenta a capacidade de se adaptar para o reconhecimento dos parasitas protozoários, como o que acontece com *T. gondii*, conseguindo detectar moléculas que são exclusivas deste parasito (YAROVINSKY, 2014).

Devido à grande diversidade genética dos hospedeiros, a resposta imune contra a infecção por *T. gondii* se torna complexa e individual (FILISSETTI; SANITA, 2004). A resposta local e sistêmica pode variar entre os indivíduos, sendo que essa resposta parece depender do *background* genético e estado imunológico do hospedeiro (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

A resposta imune desencadeada pelo *T. gondii* envolve mecanismos celulares e humorais, sendo considerada como elemento chave a imunidade celular, que é constituída por células dendríticas, macrófagos, linfócitos T e células *natural killer* (NK) juntamente com uma série de citocinas (FILISSETTI; SANITA, 2004). Com os estudos dos enterócitos infectados pelo *T. gondii* uma gama de citocinas foram encontradas, mas IFN- γ parece ser o principal na resistência contra o parasita, ativando os enterócitos e reprimindo a sua replicação (LIESENFELD, 1999b). Além das citocinas, a infecção conduz na produção de altas quantidades de anticorpos contra o parasita localmente e sistêmico. Anticorpos IgA contra o *T. gondii* foram constatados em secreções biológicas, como os do intestino e o leite. Foi capaz de diminuir a infecção em enterócitos *in vivo* (BOULT et al., 1999).

A imunidade mediada pelos linfócitos T é de suma importância no controle dos taquizoítos e na sobrevivência dos hospedeiros intermediários, visto que cepas avirulentas ao serem inoculados em animais deficientes desta célula, se tornaram altamente virulentas (GAZZINELLI et al., 1993b). Linfócitos T, assim como, as células NK (“Natural Killers”), produzem o IFN- γ e sua produção contínua de IFN- γ é essencial para controlar a infecção aguda por *T. gondii* uma vez que essa citocina parece ser responsável pela rápida conversão de taquizoítos para bradizoítos durante esta fase de infecção e por suprimir a conversão de bradizoítos para taquizoítos durante a fase crônica (MILLER et al., 2009), como também, apresenta um papel no cuidado a ruptura de cistos e encefalite, já que ao ser neutralizado com a utilização de anticorpos monoclonais durante a infecção crônica leva a reativação de cistos e morte dos camundongos, mesmo quando infectados com cepas avirulentas (SUZUKI et al.,

1989). Estudo com astrócitos de camundongos demonstrou que estes ao serem tratados com IFN- γ , antes da infecção, apresentaram uma inibição em 65% no crescimento do *T. gondii*, e ao ser combinada com TNF- α , IL-1 ou IL-6, a inibição no crescimento do parasita, elevou para 75 a 80% (HALONEN et al., 1998).

Para que as células NK sejam ativadas e assim produzir IFN- γ , a via de produção da citocina IL-12 pelos macrófagos, assim como a produção de TNF, é essencial. Essas duas citocinas trabalham em conjunto para induzirem as células NK. Durante a infecção, a produção de IL-12 é induzida por interações entre antígenos do parasito e receptores de quimiocinas 5 (CCR-5) ou receptores do tipo Toll (TLRs) iniciando uma cascata de sinalização via molécula adaptadora MyD88. Essa via também é crucial para induzir a população de linfócitos T CD4⁺ tipo 1 e linfócitos T CD8⁺ (MILLER et al., 2009), criando assim, uma imunidade específica contra *T. gondii*.

Os linfócitos T CD4⁺ produzem a citocina IL-10, responsável pela inibição da síntese de IFN- γ nas células NK e células T, atuando, portanto, como articulador das atividades dos macrófagos contra diversos patógenos, incluindo o *T. gondii* (FIORENTINO et al., 1991; GAZZINELLI et al., 1992). IL-10 inibe a produção de IFN- γ pelas células NK e linfócitos Th1, inibindo a síntese de IL-12 dos macrófagos (D'ANDREA et al., 1993). Portanto, sua ativação seria uma importante artimanha pela qual o parasita escapa da resposta imune celular dependente de IFN- γ (GAZZINELLI et al., 1992).

Outra forma de proteção do *T. gondii* é pela inibição da produção de IL-4, a atividade da caspase-3 e a libertação do citocromo-c produzida pela mitocôndria, após a invasão das células hospedeiras, além de diminuir os sinais apoptóticos das células hospedeiras durante a sua fase de proliferação (LALIBERTE; CARRUTHERS, 2008).

As moléculas de óxido nítrico (NO), resultantes do metabolismo de L-arginina em citrulina pela enzima Óxido Nítrico Sintetase induzível (iNOS) expressa em resposta a diversos estímulos incluindo IFN- γ , são produzidas por várias células da resposta imune inata, tais como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células NK sendo importantes para a resistência do hospedeiro frente à infecção por *T. gondii* (MILLER et al., 2009).

1.3 Medicamentos que inibem *T. gondii*

Os medicamentos utilizados para o tratamento da toxoplasmose apesar de eficientes apresentam problemas, porque não conseguem erradicar a infecção latente e podem causar efeitos colaterais deletérios. A infecção latente permanece após o tratamento, e com isso

ocorre recidiva da infecção, tornando se um problema em pacientes imunocomprometidos e em pacientes infectados congenitamente (MURATA et al., 2017). A sulfadiazina e pirimetamina assim como atovaquona, são as drogas consideradas de primeira escolha para o tratamento da maioria das apresentações clínicas da toxoplasmose (PETERSEN; SCHMIDT, 2003). Embora esta terapia seja frequentemente bem sucedida, está associado com diversos efeitos colaterais, como a supressão da medula óssea, o que requer a administração concomitante de ácido fólico (MARTINS-DUARTE; DE SOUZA; VOMMARO, 2013). Devido à baixa tolerância do tratamento do hospedeiro, é necessária a substituição de sulfadiazina por outras drogas, tais como a clindamicina ou azitromicina (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Assim, a descoberta de drogas menos tóxicas que são ativas contra todas as fases do parasita é crucial para o tratamento da toxoplasmose.

O uso da azitromicina ou PSA (combinação da pirimetamina, sulfadiazina e ácido fólico) é capaz de diminuir a infecção por *T. gondii* simultaneamente com a redução das secreções dos hormônios estradiol, progesterona e beta HCG em explantes de vilosidades coriônicas. Além disso, o tratamento com PSA diminui os níveis de IL-10 e aumenta a produção de IL-12; já o tratamento com azitromicina aumenta os níveis da IL-6 em explantes de vilosidades coriônicas (CASTRO-FILICE et al., 2014).

Estudo anterior, rastreou uma biblioteca de compostos químicos que apresentavam atividade anti-toxoplasma e não eram citotóxicos para célula hospedeira. Descobriram dois compostos (tanshinina IIA e hidroxizina) que inibiram a replicação do parasita após invasão e que reduziram o número de bradizoítos induzidos *in vitro*, efeito não visualizado para a pirimetamina (MURATA et al., 2017).

Plantas medicinais tornaram objetos de estudos, pois algumas pessoas utilizam as plantas herbáceas tradicionais como fonte de cura de um grande número de doenças parasitárias (NEWMAN; CRAGG, 2007). Dentre estes estudos, alguns demonstraram seus efeitos terapêuticos na toxoplasmose, surgindo como alternativa à terapia medicamentosa padrão com efeitos colaterais reduzidos (NASR et al., 2016). Estudo com infusão de *Artemisia annua* demonstrou que esta planta seria útil no controle da infecção por *T. gondii*, devido à sua baixa toxicidade e sua ação inibitória diretamente contra o parasita (DE OLIVEIRA et al., 2009; ROSTKOWSKA et al., 2016). De acordo com um estudo feito na África Ocidental, foi relatado que extratos aquosos de *Vernonia colorata* e frações com solventes orgânicos, exibiram atividade anti-Toxoplasma significativa (BENOIT-VICAL et al., 2000). Outro estudo avaliou a atividade anti-Toxoplasma de extratos metanólicos e observou-se significativa atividade anti-Toxoplasma com extratos de *Zingiber officinale*

(gengibre) e *Sophora flavescens* (CHOI; GANG; YUN, 2008). Outro estudo com gengibre também demonstra sua ação inibitória sobre *T. gondii*, além da inativação de proteínas da apoptose (p53, p21, caspase-3, e bax) que são induzidas pela proliferação de *T. gondii* em células hospedeiras infectadas (CHOI; JIANG; CHU, 2013).

1.4 *Annona muricata* Linn (Graviola)

1.4.1 Características botânicas e distribuição

Annona muricata Linn é uma espécie da família das Annonaceas, encontradas no bioma do cerrado brasileiro. É uma árvore frutífera, perene, terrestre, ereta (5-8 metro de altura). Suas folhas são arredondadas, grandes e com uma coloração verde escura brilhante. Os frutos são grandes, com forma de coração de coloração esverdeada e são comestíveis (Figura 1) (MOGHADAMTOUSI et al., 2015).



Figura 1. *Annona muricata* L. (graviola.) **A)** Árvore da *Annona muricata* L.; **B)** Folha; **C)** Flor e **D)** Fruto. Fonte: Moghadamtousi et al., 2015.

No Brasil, é conhecida como “Graviola”, e nos demais países como Soursop, Paw-Paw, Sirsak ou Guanabána. A graviola é nativa das regiões tropicais do continente americano, porém, encontra-se amplamente distribuída em outras regiões tropicais e subtropicais do mundo (ADEWOLE; CAXTON-MARTINS, 2009).

1.4.2 Utilização etnomedicinal e atividade biológica

A graviola é utilizada amplamente em estudo de doenças humanas, incluindo condições inflamatórias, reumatismo, neuralgia, diabetes, hipertensão, insônia, cistite, infecções parasitárias e câncer (ADEWOLE; CAXTON-MARTINS, 2009; TAYLOR, 2002).

Atualmente, vários estudos com cada parte da planta já foram realizados. A folha possui efeitos em várias afecções, como por exemplo: tratamento de cistite, diabetes, dores de cabeça e insônia. Além disso, acredita-se que a administração da solução resultante da ebulição das folhas, resulta em efeitos antirreumáticos e antinevrálgicos, enquanto que no cozimento são utilizadas topicamente para tratar abscessos e reumatismo (ADEWOLE; CAXTON-MARTINS, 2009; RIBEIRO DE SOUZA et al., 2009). Além disso, as folhas e outras partes da *A. muricata* possuem efeito anti-inflamatório, hipoglicêmico, sedativo, relaxante da musculatura lisa, hipotensor e antiespasmódico (ADEWOLE; CAXTON-MARTINS, 2009).

1.4.2.1 Atividade anticâncer

Diferentes estudos *in vitro* demonstraram a ação de *A. muricata* sobre células cancerígenas. Kim e colaboradores (1998) isolaram compostos do extrato etanólico da folha dessa planta e verificaram que o composto muricoreacin foi citotóxico para células de adenocarcinomas prostáticas e o composto murihexocin C mostrou ser seletivo para as linhagens celulares de adenocarcinomas prostáticos e carcinomas pancreáticos (KIM et al., 1998). Outros estudos mostraram que o extrato da folha e caule de *A. muricata* foi capaz de induzir necrose nas células cancerígenas do pâncreas e regulou negativamente a expressão de moléculas relacionadas à hipóxia e glicólise (HIF-1 γ , NF- κ B, GLUT1, GLUT4, HKII, e LDHA) *in vitro*. Além disso, a inibição da propriedade tumorigênica das células do câncer pancreático também foi observada em estudos *in vivo* (TORRES et al., 2012).

Anteriormente, foi demonstrado que o extrato n-butanólico da *A. muricata* possui efeito citotóxico para linhagens celulares de carcinoma mamário humano e de queratinócitos humanos; contudo, tal efeito não foi observado em linhagens de células normais (GEORGE et al., 2012).

Ainda, o extrato etanólico, e não o aquoso, da folha de graviola apresentou efeito anticâncer *in vitro*, sendo seletivo na citotoxicidade, em células de ascite carcinogênicas de Ehrlich e células mamárias cancerígenas; tal efeito não foi observado em células normais do baço (GAVAMUKULYA et al., 2014). O efeito anticancerígeno do extrato EtOAcAm da *A.*

muricata também foi observado em câncer pulmonar, uma vez que inibe a proliferação de células de carcinoma pulmonar *in vitro* (MOGHADAMTOUSI et al., 2014).

As acetogeninas presentes no extrato da graviola apresentaram capacidade de inibirem proteínas da família Bcl-2, as quais possuem propriedades antiapoptóticas e são associadas ao desenvolvimento de cânceres em humanos (ANTONY; VIJAYAN, 2016). Além disso, o extrato de folhas de graviola é capaz de induzir a apoptose em cultura de células de câncer colorretal por meio do aumento dos níveis de caspase-3 (ABDULLAH et al., 2017).

Além disso, um estudo de caso mostrou que uma paciente com câncer de mama metastático apresentou estabilização da doença após o consumo de folhas de graviola associado ao tratamento quimioterápico convencional (HANSRA et al., 2014).

1.4.2.2 Atividade antioxidante

Estudos recentes demonstraram que os produtos naturais apresentam notável papel em anular os efeitos destrutivos de ROS (espécies reativas de oxigênio), surgindo assim grande interesse na identificação de suas atividades antioxidantes.

Estudos realizados com folhas, caules e sementes da graviola sugerem que esses são fontes naturais de agentes antioxidantes. Os extratos aquosos e metanólico da graviola mostraram atividade antioxidante, acompanhados do efeito protetor do DNA contra a toxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (GEORGE et al., 2015). Como também um estudo *in vitro* demonstrou que a folha da *A. muricata* apresenta uma maior atividade antioxidante em relação a outras plantas da família das Anonaceas, com eficiente papel no sequestro de radicais livres, ampliando assim sua atividade terapêutica (BASKAR; RAJESWARI; KUMAR, 2007).

Previamente, foi demonstrado que as sementes e as folhas da graviola apresentam atividades oxidantes enzimáticas (catalase e superóxido dismutase) e não enzimáticas (vitamina C e E) (VIJAYAMEENA et al., 2013). Enquanto que um estudo com o extrato etanólico da casca notou seu potencial adaptogênico, visto que ratos que passaram por estresse de imobilização a frio apresentaram peroxidação lipídica reduzida no cérebro e no fígado (PADMA, 1997; PADMA et al., 2001).

Recentemente, foi demonstrado que as frações EtOAc (EtOAcAm) e BuOH (n-butanol) da folha da graviola apresentaram uma alta capacidade antioxidante (JUSTINO et al., 2018).

1.4.2.3 Atividade anti-inflamatória e antinociceptivo

Estudo com a folha da *A. muricata* demonstrou diminuição dos efeitos causados pela artrite por meio da supressão local de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-1 β), sendo possível verificar seu potencial anti-inflamatório tanto na fase aguda como na crônica (HAMID et al., 2012). De forma similar, o extrato etanólico da folha resultou na diminuição do edema e aumento do limiar de dor das patas de ratos Wistar, também com uma redução na migração de leucócitos e no volume de exsudado peritoneal, mostrando também o efeito anti-inflamatório da *A. muricata* (RIBEIRO DE SOUZA et al., 2009). Da mesma forma, o teste da formalina como indutor de inflamação e as respostas da lamber e o teste da placa quente também corroboraram o efeito analgésico acentuado das folhas de *A. muricata* (HAMID et al., 2012; RIBEIRO DE SOUZA et al., 2009).

Assim como demonstrou que o extrato etanólico da folha da graviola possui poderosa atividade antinociceptiva e gastroprotetora mediante a supressão das contorções abdominais e diminuição na área das lesões gástricas induzidas pela administração oral de ácido acético em camundongos (HAMID et al., 2012). Além disso, o extrato da fração EtOAcAm de graviola demonstrou ter potencial anti-ulcerativo, atribuído ao seu efeito supressor do dano oxidativo e à capacidade de preservar a mucosa da parede gástrica (MOGHADAMTOUSI et al., 2014).

Além disso, também foi observado efeito anti-inflamatório e antinociceptivo em ratos tratados com o extrato da fruta anteriormente a indução da inflamação. Acredita-se que a ação antinociceptiva ocorreu por meio da interação com a via opioidérgica e a propriedade anti-inflamatória por meio da inibição de mediadores pró-inflamatórios, como ciclooxigenase 1 e 2 (ISHOLA et al., 2014). Assim, esses achados demonstraram os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios da *A. muricata* e substanciaram seu consumo tradicional como analgésico.

1.4.2.4 Atividade antiparasitária

Atualmente, surgiu-se o interesse em determinar os efeitos da graviola sobre vários parasitas patogênicos, principalmente protozoários, por serem de elevada importância em saúde pública por causarem doenças graves, como a leishmaniose e a tripanossomíase, atingindo uma porção considerável da população mundial. Outro fator importante é a resistência desses parasitas aos fármacos já comercializados e os efeitos colaterais que alguns medicamentos apresentam ao longo do tratamento, criando assim a necessidade de testar novas substâncias (MOGHADAMTOUSI et al., 2015).

Inicialmente, análises *in vitro* demonstraram que a *A. muricata* apresentou atividade contra *Plasmodium falciparum* (BIDLA et al., 2004; NGUYEN-POUPLIN et al., 2007). De forma semelhante, a folha da graviola demonstrou-se eficaz no controle de cepas de *Plasmodium* sensíveis e resistentes à cloroquina (KAUSHIK et al., 2013; OSORIO et al., 2007). Sendo assim, esses achados fundamentam o uso da graviola como um potencial agente antimalárico.

Ainda, foi observado que a fração EtOAcAm obtida da folha da graviola apresentou um potencial leishmanicida contra *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani* (OSORIO et al., 2007), sendo sua atividade antiparasitária maior do que Glucantimes® (medicamento utilizado para o tratamento da Leishmaniose), quando testada contra a *L. braziliensis* e *L. panamenis* (JARAMILLO et al., 2000). Esse efeito antiparasitário de *A. muricata* também foi observado contra *Trypanosoma cruzi* em experimento *in vitro* (OSORIO et al., 2007).

Os compostos anonacinona e corossolona, isolados da semente da *A. muricata* demonstraram alta atividade antiparasitária contra *L. donovani*, *L. mexicana* e *L. major* e uma alta inibição da viabilidade das formas promastigota e amastigota desta espécie (VILANOVA et al., 2011, 2013).

Estudos contra helmintos também foram realizados e verificou-se que o extrato metanólico da semente da *A. muricata* apresentou significativa atividade antiparasitária contra as larvas infectantes de *Molinema dessetae* (BORIES et al., 1991). Enquanto que uma investigação *in vitro* com o extrato aquoso de folhas demonstrou possuir uma atividade anti-helmíntica promissora, apresentando toxicidade contra os diferentes estágios evolutivos do parasita gastrointestinal *Haemonchus contortus* (FERREIRA et al., 2013).

2 JUSTIFICATIVA

As drogas atualmente comercializadas para o controle da infecção por *T. gondii* apresentam efeitos colaterais intensos, novos estudos utilizando tratamentos alternativos e eficazes para a toxoplasmose são de grande valia. O uso de plantas medicinais, como *A. muricata* para o tratamento de doenças parasitárias ou não, tem apresentado efeitos benéficos. Sendo assim, a investigação dos efeitos de *A. muricata* durante a toxoplasmose experimental seria importante para o desenvolvimento de um tratamento alternativo para essa zoonose que acomete grande parte da população mundial (ESKILD et al., 1996).

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção por *T. gondii* causa pouco ou nenhum sinal evidente da doença em seus hospedeiros, devido à imunidade protetora eficiente, mas em pacientes imunocomprometidos ou durante a gravidez, *T. gondii* pode emergir como uma infecção grave, que se não tratada pode levar à morte do hospedeiro. Até o presente momento não existe um tratamento que seja sabidamente eficaz em parasitos encistados e algumas drogas utilizadas não são bem toleradas. Dessa forma, estudo de produtos menos tóxicos que não sejam teratogênicos e que consigam controlar o parasito é de extrema importância. Portanto, nesse estudo utilizamos o extrato da planta *A. muricata* (Graviola) e suas frações em experimentos *in vitro* utilizando células não hematopoiéticas, fibroblastos, e de origem hematopoiética, macrófagos em ensaios de infecção, tratamento e controle do parasito, como também, o efeito destes extratos no controle da infecção experimental por *T. gondii in vivo*. Escolhemos esta planta por suas propriedades anti-inflamatórias já conhecidas e também por relatos prévios mostrando efeito contra *Plasmodium* spp., parasito pertencente ao mesmo filo de *T. gondii*.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o papel dos extratos das folhas da planta *A. muricata* (Graviola) durante infecção por *T. gondii* em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Específicos

1. Avaliar e quantificar o parasitismo das células por detecção da atividade de β -galactosidase após o tratamento com extratos e infectadas com *T. gondii*.

2. Avaliar e quantificar a produção de óxido nítrico em células tratadas e/ou infectadas com *T. gondii*.

3. Avaliar a mortalidade e morbidade de fêmeas dos camundongos C57BL/6 infectados por via oral com 20 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e tratados ou não com os extratos da *A. muricata* (Graviola);

4. Avaliar o parasitismo intestinal, pulmonar e hepático aos 8 dias e no cérebro aos 30 dias de infecção por imunohistoquímica e verificar alterações histológicas por colocações por H&E e Alcian Blue em animais tratados e infectados.

5. Avaliar as alterações histológicas nos órgãos dos animais infectados e tratados com os extratos de *A. muricata*;

6. Avaliar o perfil de transaminase glutâmico-pirúvica e lipídico no soros dos animais tratados com os extratos de *A. muricata* e infectados

7. Avaliar o perfil sorológico de citocinas, tais como IFN- γ , IL-10, TNF, TGF- β por ELISA no soro aos 8 dias de infecção e tratamento com o extrato etanólico bruto de *A. muricata*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal, extração etanólica e particionamento líquido-líquido

Folhas secas da *A. muricata* (Graviola) foram obtidas de Florian (Piracicaba, SP).

Para obtenção do extrato etanólico bruto da *A. muricata* (EtOHAm), a extração etanólica foi realizada conforme descrito anteriormente (JUSTINO et al., 2018). Aproximadamente dois quilos de folhas secas da *A. muricata* foram cortadas em pequenos pedaços, misturadas e extraídas em 10 litros de etanol a 98% (1:5, kg/l). A mistura dos materiais foi realizado manualmente, duas vezes por dia, ficando por um período de seis dias. Após este período, a solução foi filtrada e o solvente extrativo foi removido, usando um rotaevaporador (Bunchi Rotavapor R-210, Suíça) sob pressão reduzida a 40 °C. O extrato foi congelado e liofilizado para remover a água restante. Para o particionamento líquido-líquido, o extrato etanólico foi solubilizado em 200 mL de solução metanol:água (9:1, v.v⁻¹). Utilizando um funil de separação, o particionamento líquido-líquido foi realizado utilizando-se solventes cada vez mais polares: hexano, diclorometano, acetato de etila, n-butanol e água. Os solventes extrativos foram removidos usando um rotaevaporador sob pressão reduzida a 40 °C; as frações foram congeladas e liofilizadas para remover a água restante.

Para análises *in vitro*, todos os extratos foram solubilizados em DMSO. Preparou-se uma solução-estoque (10 mg/ml) e as soluções de trabalho foram diluídas em meio de cultura. Relacionado a estudos *in vivo*, os extratos foram solubilizados em uma solução estoque (30 mg/ml) com 14% de DMSO em PBS. As soluções de tratamento foram preparadas por adição de PBS à solução estoque, resultando em uma solução de 12% de DMSO em PBS.

4.2 Cultura de células e parasitas

As linhagens celulares murinas, fibroblastos NIH/3T3 e macrófagos J774 foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA) e cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) ou Dulbecco Meio de Eagle modificado (DMEM; Cultilab, Campinas, SP, Brasil), respectivamente, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (ambos os reagentes da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) em uma estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO₂.

Os taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH clone 2F1, que expressam constitutivamente a β -galactosidase, foram gentilmente cedidos por Dr. Vern Carruthers, da Escola de Medicina da Universidade de Michigan (EUA). Os parasitas foram propagados em fibroblastos (NIH/3T3) ou macrófagos (J774) e as células mantidas em RPMI 1640 ou DMEM suplementado com penicilina, estreptomicina e 2% de SFB a 37 °C e 5% de CO₂.

Para experimentos *in vivo*, a cepa ME49 de *T. gondii* foi utilizada neste estudo. O parasita foi mantido em camundongos Swiss, que foram inoculados pela via intraperitoneal (i.p.) com 10 cistos de *T. gondii*. Com no mínimo um mês após a inoculação, os cistos cerebrais foram coletados, processados e utilizados para infectar os animais.

4.3 Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos NIH/3T3 tratados com EtOHAm e suas frações

Os fibroblastos NIH/3T3 foram cultivados em placa de 96 poços (3 x 10⁴ células/poço/200 μ l) em RPMI suplementado com 10% de SFB (Cultilab), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100/ml estreptomicina (Sigma), durante 24 horas em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações (10, 50, 100, 200, 500 e 1000 μ g/ml) do EtOHAm (extrato bruto etanólico da *Annona muricata*) e das frações HexAm (fração hexano da *Annona muricata*), CH₂Cl₂Am (fração diclorometano da *Annona muricata*), EtOAcAm (fração acetato de etila da *Annona muricata*), BuOH (fração n-butanol da *Annona muricata*) e H₂OAm (fração aquosa da *Annona muricata*), por mais 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT (MOSMANN, 1983). Resumidamente, as células foram lavadas e incubadas 10 μ L do reagente *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (MTT) (Sigma-Aldrich) a 5mg/mL, acrescidos de 90 μ L de meio a 10% de SFB (1:10), durante 4 h a 37 °C e 5% de CO₂. Após este tempo, o sobrenadante foi descartado e as células foram solubilizados pela adição de 150 μ L/poço de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em N,N-dimetil formamida (DMF) a 50% (p/v) e bem misturadas para dissolver os cristais azuis escuros de formazan. A absorbância foi determinada a 570 nm em leitora de microplacas (Leitor de Microplacas Versa Max ELISA, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). A porcentagem de células viáveis foi calculada em todas as condições experimentais em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura), o que correspondeu a 100% de viabilidade.

4.4 Quantificação da proliferação intracelular de parasitas

Para avaliar a proliferação de *T. gondii*, fibroblastos NIH/3T3 ou macrófagos J774 foram cultivados em placa de 96 poços (3×10^4 células/poço/200 μ l) como descrito anteriormente, durante 24 h e após esse período foram infectados com taquizoítos clone 2F1 de *T. gondii* em uma proporção de cinco parasitas por célula (5:1). Após 4 horas de infecção, as células foram lavadas com meio para remover parasitas extracelulares e tratadas com diferentes concentrações do EtOHAm (20, 50, 100, 120, 140, 180 e 200 μ g/ml), frações HexAm ou CH₂Cl₂Am (10, 20 e 50 μ g/ml), EtOAcAm, BuOH ou a H₂OAm (10, 50, 100, 160 e 200 μ g/ml) pelo período de 24 h. Após este período, a proliferação intracelular de *T. gondii* foi determinada por ensaio colorimétrico de β -galactosidase adicionando 50 μ l do substrato CPRG (chlorophenol red- β -d-galactopyranoside) (TEO et al., 2007). A enzima β -galactosidase dos parasitas viáveis reagiram com o substrato resultando em uma coloração avermelhada, portanto, essa cor foi mensurada na leitora de microplacas (Leitor de Microplacas Versa Max ELISA, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) a 570 nm. O resultado foi expresso pelo número de taquizoítos que se utilizou para o cálculo da curva padrão. Para a realização da curva, colocou-se 10^6 taquizoítos da cepa de *T. gondii* nos dois primeiros poços da placa e realizou-se uma diluição dupla seriada até o sétimo poço, ficando o último apenas com PBS, representando o branco da reação.

4.5 Determinação dos níveis de nitrito em sobrenadantes de macrófagos J774 tratados com EtOHAm, LPS ou IFN- γ e infectados ou não com *T. gondii*

Para analisar a produção de NO após tratamento com EtOHAm, células J774 foram cultivadas em placa de 96 poços (3×10^4 células/poço/200 μ l) e infectadas com taquizoítos clone 2F1 de *T. gondii* em uma proporção de cinco parasitas por célula (5:1). Em seguida, as células foram tratadas com LPS (1 μ g/ml), EtOHAm (50, 100, 120, 140, 180 e 200 μ g/ml) ou IFN- γ (1,5 ng/ml) por 24h e a concentração de nitrito no sobrenadante foi mensurada pelo método de Griess (GREEN et al., 1982) como um indicativo de produção de NO. Células tratadas com LPS foram utilizadas como controle.

4.6. Animais e grupos experimentais

Para a realização do experimento *in vivo*, foram utilizados camundongos fêmeas, da linhagem C57BL/6, com idade experimental entre 8-12 semanas de idade. Foram mantidas em condições padrão na unidade de criação de animais da Universidade Federal de Uberlândia, CBEA - Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (Rede de Biotérios de Roedores da UFU). Os animais foram mantidos em condições ambientais padrão, com o ambiente climatizado permanecendo com a temperatura entre 23 a 25°C, com ciclos de luminosidade de 12 h (ciclo claro/escuro) e alimentados com ração padrão de roedores e água filtrada autoclavadas que foram disponibilizados *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, com o número de protocolo 006/15.

Os animais foram divididos em vinte e dois grupos experimentais com um n= 5 animais por grupo. Os grupos experimentais estão descritos a seguir:

✓ Não-infectado

✓ Infectados e Não Tratados

- ✓ Infectados e Tratados com
 - Sulfadiazina
 - EtOHAm
 - 2,5 mg/animal/dia
 - 5 mg/animal/dia
 - 10 mg/animal/dia
 - Fração EtOAcAm
 - 2,5 mg/animal/dia
 - Fração HexAm
 - 2,5 mg/animal/dia
 - 5 mg/animal/dia
 - Fração CH₂Cl₂Am
 - 2,5 mg/animal/dia
 - 5 mg/animal/dia

Os animais foram eutanasiados com 8 dias de infecção, caracterizando a fase aguda da doença (12 grupos) e aos 30 dias de infecção, caracterizando a fase crônica da doença (10 grupos).

4.7 Tratamentos e infecção por *T. gondii*

Os camundongos foram infectados oralmente com 20 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* em 200 µl de PBS, via gavagem. Um dia após a infecção, os grupos foram tratados oralmente com EtOHAm 2,5, 5 ou 10 mg/animal/dia diluído em 12% DMSO/PBS (veículo) por gavagem em um volume final de 200 µl. Adicionalmente, outros grupos foram tratados oralmente com 2,5 mg/animal/dia diluído em 12% DMSO/PBS (veículo) da fração EtOAcAm; 2,5 ou 5 mg/animal/dia diluído em 12% DMSO/PBS (veículo) das frações HexAm e CH₂Cl₂Am em um volume final de 200 µl. Todos os grupos foram tratados diariamente até o oitavo dia após a infecção, ou seja, tratamento com duração de sete dias. Os pesos dos animais foram anotados diariamente até o oitavo dia, após esse período, foi realizado em dias alternados, para observar a variação no peso corporal e no escore corporal (Fig. 2).

No dia 8 ou 30 após a infecção, camundongos foram anestesiados com Cetamina (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil)/Xilazina (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil) intraperitonealmente (SILVA et al., 2009), e eutanasiados pelo método de deslocamento cervical. Os órgãos (pulmão, fígado, intestino delgado e cérebro) foram coletados para análise histológica. O sangue dos animais foi coletado através do plexo retro orbital, sendo posteriormente centrifugado para a retirada do soro e este foi congelado a -80°C até o momento do uso. O mesmo foi utilizado para dosagem de citocinas, lipídios e TGP (transaminase glutâmico pirúvica).

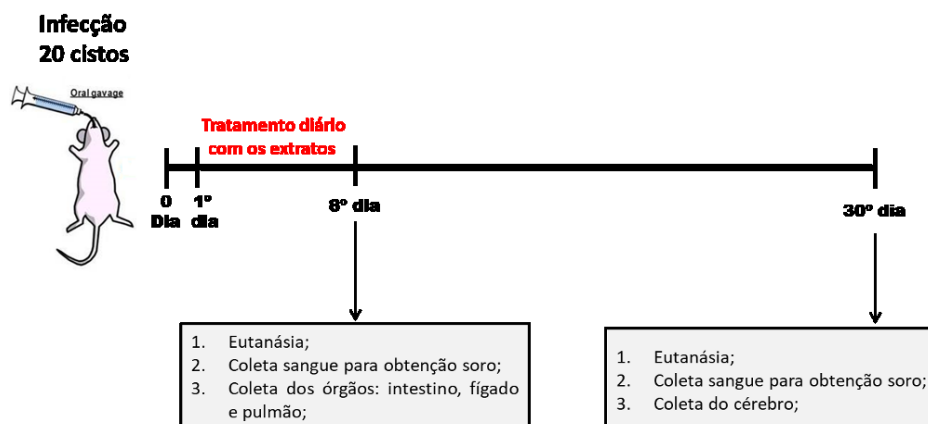


Figura 2. Desenho experimental. Esquema de tratamento e coleta de amostras realizado nos grupos experimentais.

4.8 Análise histológica

Para observação de alterações histológicas nos órgãos dos grupos experimentais, estes foram incluídos em parafina e posteriormente cortes teciduais foram realizados e colocados em lâminas de vidro. Essas lâminas passaram pelo processo de desparafinização em xilol durante 30 minutos, foram hidratadas em álcoois de concentrações decrescentes (100, 95, 85 e 70%) durante 1 minutos cada, água corrente por 10 minutos e por fim água destilada por 5 minutos. A seguir as lâminas contendo os cortes ficaram imersas em Hematoxilina de Harris por 1 minuto e 30 segundos em média. Procedeu-se um banho em água corrente durante 10 minutos, sendo logo após, imersas em Eosina por 40 segundos e lavadas em água corrente rapidamente. Para montagem das lâminas, as mesmas foram desidratadas em álcoois de concentrações crescentes (70, 85, 95, 100%), durante 10 segundos cada e depois três banhos em xilol por 15 minutos. As lâminas foram montadas entre lâmina e lamínula e Bálamo do Canadá. Essa coloração foi utilizada para análise histológica e quantificação das células de Paneth. Foram analisadas 100 criptas de cada parte do intestino delgado em microscópio óptico com objetiva de 40x de aumento em ensaio cego. A análise do escore inflamatório hepático foi realizada pela quantificação dos focos inflamatórios em 10 campos teciduais em microscópio óptico com objetiva de 10x de aumento, em ensaio cego. Já para análise do escore inflamatório pulmonar, foram realizadas em média em 10 imagens obtidas em microscópio de captura LEICA DM 500 e essas imagens foram analisadas pelo programa de análises de imagem ImageJ 1.50i (National Institutes of Health, USA), onde foi realizado a estimativa da área do parênquima em porcentagem.

Para a quantificação de células caliciformes no intestino delgado, as lâminas passaram pelo mesmo processo de desparafinização e re-hidratação, depois foram banhadas em solução de ácido acético glacial PA 3% por 3 minutos, após ficaram imersas por 2 h em solução de Alcian Blue 1% a temperatura de 45°C. Após este período foram lavadas em água corrente e sendo logo após, imersas em Eosina por 1 minuto e 30 segundos, e lavadas em água corrente rapidamente e posteriormente desidratadas e realizada a montagem. A quantificação foi realizada em 200 campos teciduais e foi utilizado microscópio óptico com objetiva de 40x de aumento em ensaio cego.

4.9 Imunohistoquímica para detecção e quantificação de *T. gondii*

O parasitismo foi avaliado nos órgãos por imunohistoquímica, como descrito anteriormente (SILVA et al., 2009). Resumidamente, os cortes foram desparafinizados e incubados à temperatura ambiente com solução salina tamponada com fosfato (PBS) mais 0,3% de leite desnatado Molico (Nestlé, São Paulo, SP, Brasil) para reduzir sítios inespecíficos de ligação e depois incubados a 4°C durante a noite com anticorpo policlonal anti-*T. gondii* (obtido de camundongos Swiss infectados com a cepa ME49) diluído em 0,01% de saponina. Após incubação com anticorpo secundário biotilado durante 60 minutos, produzido em cabra anti-camundongo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA), a sensibilidade do ensaio foi amplificada pela adição do complexo avidina-biotina-peroxidase (kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) durante 30 minutos. A reação foi desenvolvida com H₂O₂ a 0,03% mais tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma) durante 5 min. Os cortes foram contrastados com hematoxilina de Harris e examinados ao microscópio óptico, utilizando uma objetiva de 40x. O parasitismo tecidual foi quantificado pela contagem do número de estruturas semelhantes a cistos e vacúolos parasitóforos em cinquenta campos microscópicos no pulmão ou em um hemisfério cerebral; no tecido hepático e intestinal foram quantificados em duzentos campos microscópicos.

4.10 Análise do Perfil de Citocinas (IL-10, IFN- γ , TGF- β e TNF) no soro dos camundongos infectados

As concentrações de citocinas em amostras de soro de camundongos não infectados ou infectados e tratados foram mensuradas por ensaio imunoenzimático (ELISA). As citocinas IL-10, TNF (OptA, BD Bioscience, San Diego, CA, EUA) e IFN- γ e TGF- β (Duoset R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA), foram analisadas de acordo com as instruções dos fabricantes. As concentrações de citocinas nas amostras de soro foram calculadas a partir de uma curva padrão de cada citocina recombinante murina. Os limites de detecção nos testes ELISAs foram de 31,3 pg/mL (IFN- γ), 15,6 pg/mL (TNF), 15,6 pg/mL (TGF- β) e 31,3 pg/mL (IL-10).

4.11 Dosagem sérica de transaminase pirúvica (TGP)

O nível sérico de transaminase pirúvica (TGP) foi determinado utilizando kit comercial (Labtest Diagnóstica S.A. - Belo Horizonte, MG, Brasil). As amostras de sangue foram centrifugadas a 800xg durante 10 minutos e as alíquotas de soro foram transferidas para um tubo limpo e armazenadas no ultrafreezer à -80°C até o momento da análise.

4.12 Análise de Perfil Lipídico (Colesterol total, Triglicerídeos, HDL-c, LDL-c, VLDL)

Os níveis séricos de lipídios foram determinados utilizando kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A. - Belo Horizonte, MG, Brasil). As amostras de sangue foram centrifugadas a 800 xg durante 10 minutos e alíquotas de soro foram transferidas para um tubo limpo. As concentrações de colesterol total, HDL e triglicerídeos no soro foram mensuradas seguindo as instruções do kit para cada parâmetro. Os níveis séricos de LDL e VLDL foram estimados usando a equação de Friedewald (FRIEDEWALD et al., 1972).

4.13 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média \pm S.E.M de grupos experimentais. As comparações entre diferentes condições experimentais *in vitro* foram analisadas pela comparação múltipla ANOVA e Bonferroni unidirecional. Considerando as comparações *in vivo*, o método Kaplan-Meier foi utilizado para comparar as taxas de sobrevivência dos animais experimentais e a curva de sobrevivência foi comparada usando Teste do Quiquadrado (χ^2) e long-rank teste. Diferenças entre grupos foram analisadas usando teste One-Way ANOVA Kruskal-Wallis, quando apropriado com o respectivo pós-teste de comparação múltipla Bonferroni para examinar todas as possíveis comparações pareadas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular de Fibroblastos NIH/3T3 tratados com EtOHAm e suas frações

Com o objetivo de verificar a ação do extrato bruto etanólico de *A. muricata* (EtOHAm) e de suas frações sobre a viabilidade celular, realizamos o ensaio de MTT em fibroblastos murinos NIH/3T3.

Verificamos que o EtOHAm não apresentou interferência na viabilidade celular nas concentrações 10 - 100 µg/ml. Utilizando-se a dose de 200 µg/ml de EtOHAm 80% das células apresentaram-se viáveis. Já os tratamentos com 500 e 1000 µg/ml apresentaram-se citotóxicos para as células, uma vez que a viabilidade das mesmas foi menor diante dessas concentrações, tornando-as inadequadas para as demais análises (Fig. 3A).

Quando o extrato bruto foi fracionado, a fração HexAm mostrou-se citotóxica para os fibroblastos a partir da concentração de 50 µg/ml (Figura 3B). Já a fração CH₂Cl₂Am diminuiu significativamente a viabilidade celular a partir de 100 µg/ml (Figura 3C). Tanto a fração EtOAcAm quanto BuOH apresentaram-se citotóxicas a partir da concentração de 500 µg/ml (Figura 3D, 3E). Com relação à fração AM/aquosa, apenas a concentração de 1000 µg/ml induziu uma queda significativa na viabilidade celular (Fig. 3F). Sendo assim, aquelas concentrações de frações que apresentaram significativa diminuição da viabilidade celular também foram retiradas das seguintes análises *in vitro*.

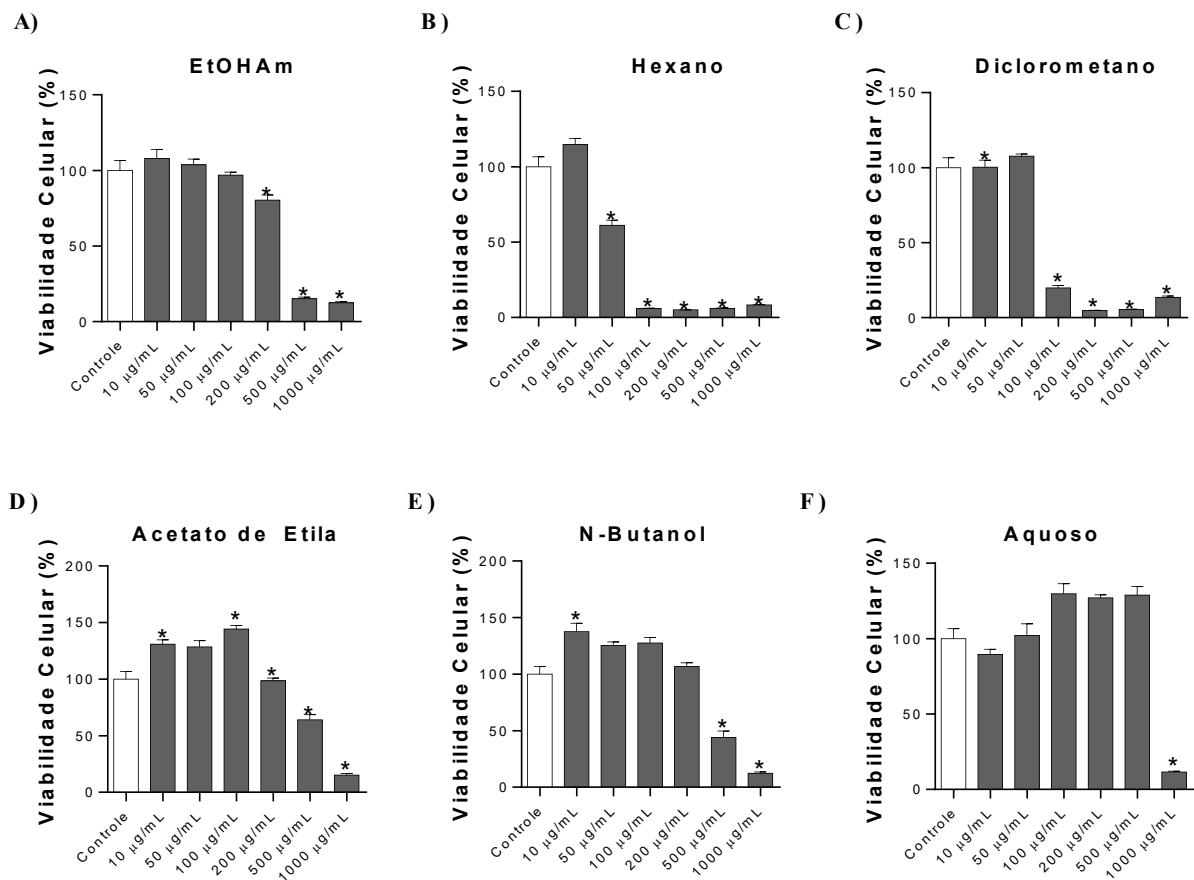


Figura 3 Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos NIH/3T3 tratados com extrato bruto etanólico de *Annona muricata* e suas frações. Células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico bruto de *A. muricata* (EtOHAm) e de suas frações ou com meio de cultura (controle). Depois de 24 h de tratamento, a viabilidade celular foi verificada pelo método MTT. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao grupo controle. **A)** EtOHAm; **B)** Fração HexAm; **C)** Fração CH₂Cl₂Am; **D)** Fração EtOAcAm; **E)** Fração BuOH; **F)** Fração aquosa. Resultados foram expressos como média ± SEM da % do número de células viáveis e são representativas de experimento realizado em quintuplicata. Os dados foram analisados pelo teste estatístico One-Way ANOVA e pós-teste de múltipla comparação de Bonferroni. *: Denota diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle (meio de cultura) ($p < 0.05$).

5.2 EtOHAm bruto apresenta ação anti-*T. gondii*

Para determinar se o EtOHAm e suas frações interferem na proliferação de *T. gondii*, tanto fibroblastos murinos NIH/3T3 quanto macrófagos murinos J774 foram infectados e tratados com os extratos. Em ambas as linhagens celulares, o EtOHAm apresentou ação antiparasitária (Fig. 4A, 4B). Nos fibroblastos, doses superiores a 20 µg/ml de EtOHAm foram capazes de controlar a replicação de *T. gondii*, porém, as doses de 100 a 200 µg/ml apresentaram um efeito mais proeminente (Fig. 4A). Nos macrófagos, de modo semelhante, os tratamentos com doses de 100 a 200 µg/ml mostraram maior controle na proliferação parasitária (Fig. 4B).

Com relação as frações do extrato, algumas delas mostraram-se eficientes no controle de *T. gondii*. Os fibroblastos NIH/3T3 infectados e tratados com a fração HexAm a 20 e 50 $\mu\text{g/ml}$, CH₂Cl₂Am a 10 e 50 $\mu\text{g/ml}$ e EtOAcAm a 200 $\mu\text{g/ml}$ apresentaram ação antiparasitária (Fig. 5A-C). Contudo, as frações BuOH e aquosa não tiveram a capacidade de impedir a proliferação parasitária, independentemente da concentração utilizada (Fig. 5D e E).

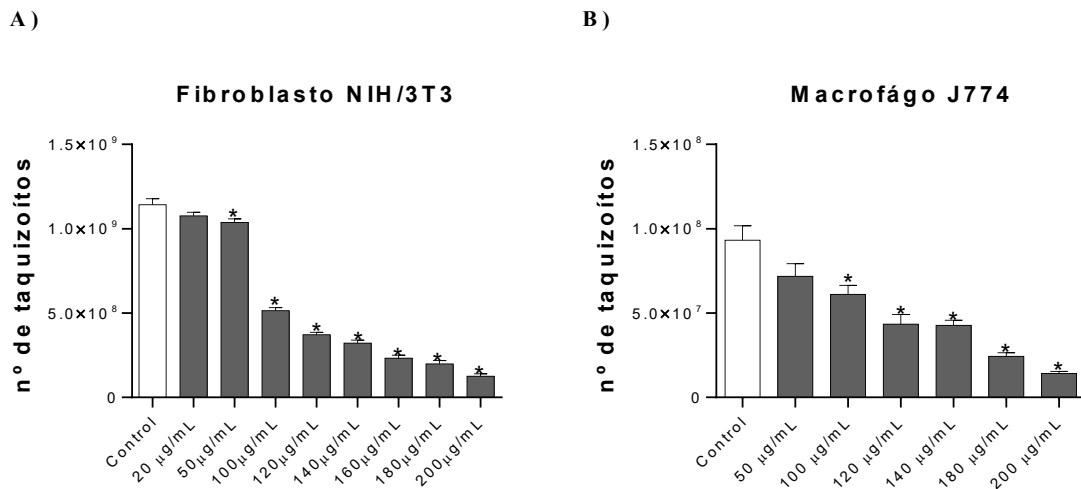


Figura 4. Proliferação intracelular de *T. gondii* nos macrófagos J774 e fibroblastos NIH/3T3 tratados com extrato bruto da *Annona muricata*. As células foram infectadas 1:5 com taquizoítos, depois de 4 h de incubação foram tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico bruto da *A. muricata* (EtOHAm) por 24 h, então a proliferação de *T. gondii* sob essas condições foram analisadas pela mensuração da atividade enzimática da β -galactosidase do parasito, o qual foi revelada pela adição do substrato CPRG e a leitura à 570 nm. **A)** Fibroblastos NIH/3T3 tratados com EtOHAm; **B)** Macrófagos J774 tratados com EtOHAm. Resultados foram expressos pela média \pm SEM do número de taquizoítos e são representativos de um experimento em quintuplicata. Os dados foram analisados pelo método estatístico One-Way ANOVA e pós-teste de múltipla comparação de Bonferroni. *: Denota diferença estatística significativa entre os tratamentos em comparação ao grupo controle ($p < 0.05$).

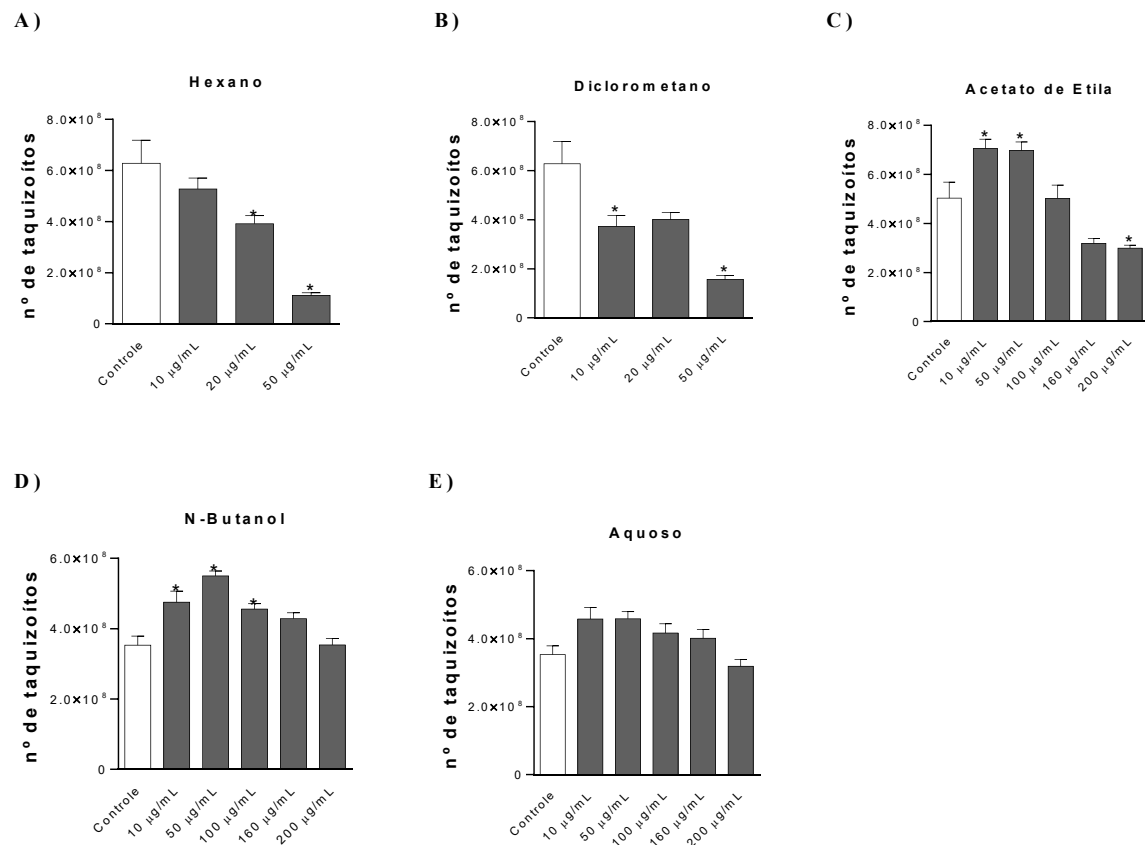


Figura 5. Proliferação intracelular de *T. gondii* nos fibroblastos NIH/3T3 tratados com as frações da *Annona muricata*. As células foram infectadas 1:5 com taquizoítos, depois de 4h de incubação foram tratadas com diferentes concentrações das frações da *Annona muricata* por 24 h, então a proliferação de *T. gondii* sob essas condições foram analisadas pela mensuração da atividade enzimática da β -galactosidase do parasito, o qual foi revelada pela adição do substrato CPRG e a leitura à 570 nm. **A)** fração HexAm; **B)** fração CH2Cl2Am; **C)** fração EtOAcAm; **D)** fração BuOH e **E)** fração aquosa. Resultados foram expressos pela média \pm SEM do número de taquizoítos e são representativos de um experimento em quintuplicata. Os dados foram analisados pelo método estatístico One-Way ANOVA e pós-teste de múltipla comparação de Bonferroni. *: Denota diferença estatística significativa entre os tratamentos em comparação ao grupo controle ($p < 0.05$).

5.3 EtOHAm aumenta os níveis de NO em células J774 infectadas com *T. gondii*

Como um indicativo da produção de NO, os níveis de nitrito foram mensurados no sobrenadante dos macrófagos murinos J774 diante da infecção por *T. gondii* e tratamento com IFN- γ ou EtOHAm. As células estimuladas com IFN- γ aumentaram significativamente os níveis de nitrito (Fig. 6; $p < 0,05$). O tratamento com EtOHAm, independente da concentração utilizada, foi capaz de aumentar os níveis de nitrito no sobrenadante das células infectadas (Fig. 6; $p < 0.05$).

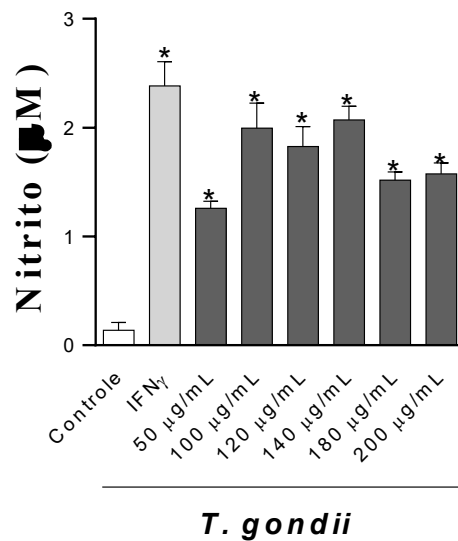


Figura 6 - Determinação dos níveis de nitrito em macrófagos murinos J774 estimulados com extrato etanólico da *Annona muricata* e infectados com *T. gondii*. Células J774 infectadas com *T. gondii* foram tratadas por 24 h com IFN- γ (1,5 ng/ml) e diferentes concentrações do extrato etanólico bruto da *A. muricata*. A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada pelo método de Griess. Resultados foram expressos pela média \pm SEM da concentração de nitrito e foram representativas de um experimento realizado em quintuplicata. Os dados foram analisados pelo método estatístico One-Way ANOVA e pós-teste de múltipla comparação Bonferroni. *: Denota diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos em comparação ao grupo controle ($p < 0.05$).

5.4 O tratamento com EtOHAm influencia nos parâmetros clínicos de camundongos C57BL/6 infectados por *T. gondii*.

Uma vez que nossos experimentos *in vitro* demonstraram que o extrato etanólico bruto (EtOHAm) e as frações EtOAcAm, CH₂Cl₂Am e HexAm não apresentaram efeito citotóxico e ação antiparasitária em baixas e médias concentrações, decidimos investigar se esses tratamentos teriam a mesma ação *in vivo*. Para isso, camundongos C57BL/6 foram infectados com *T. gondii* e tratados com sulfadiazina (500 mg/l), EtOHAm (2,5, 5 ou 10 mg/animal/dia), frações HexAm e CH₂Cl₂Am (2,5 ou 5 mg/animal/dia) e EtOAcAm (2,5 mg/animal/dia) e acompanhados quanto a mortalidade e parâmetros clínicos (peso e escore de morbidade) durante 30 dias após-infecção. Uma vez que já é sabido que a sulfadiazina é capaz de controlar o parasito *in vivo*, porém não eliminá-lo (SILVA et al., 2002) esse medicamento foi utilizado como controle do tratamento da toxoplasmose experimental.

Como esperado, o grupo tratado com sulfadiazina apresentou menor perda de peso e baixo escore de morbidade, acompanhado de uma alta taxa de sobrevivência (100%) em relação aos demais grupos infectados (Fig. 7).

Os camundongos tratados com EtOHAm ou suas frações apresentaram escores de morbidade, variação de peso corporal e sobrevivência semelhantes aos camundongos infectados, indicando que o extrato de *A. muricata* não é capaz de alterar tais parâmetros durante a infecção por *T. gondii* (Fig. 7A-C). Apenas os grupos tratados com 10 mg do EtOHAm, 5 mg da fração HexAm e 2,5 mg da fração CH₂Cl₂Am apresentaram sobrevivência de 100% no período analisado (30 dias pós-infecção).

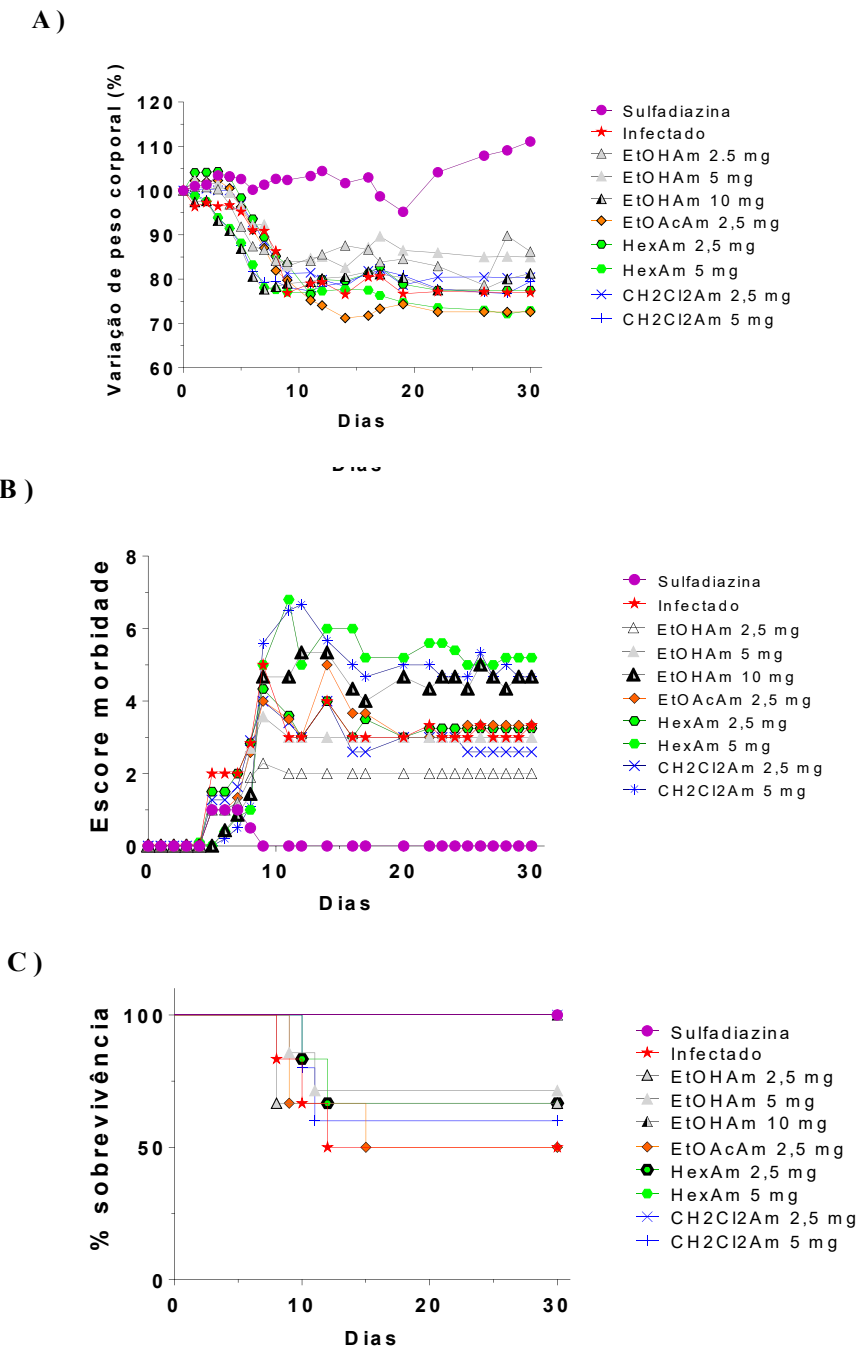


Figure 7 - Variação do peso corporal (%), escore de morbidade e curva de sobrevivência de camundongos infectados com *T. gondii* e tratados com extrato de *Annona muricata* (Am) e suas frações. Os animais foram

infectados com 20 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* por via oral e tratados com diferentes concentrações do extrato etanólico bruto da *A. muricata* (EtOHAm) e as frações EtOAcAm, HexAm e CH₂Cl₂Am. O grupo veículo consiste nos animais infectados e tratados com 12% DMSO/PBS. **A)** Variação do peso corporal; **B)** Escore de morbidade com 30 dpi; **C)** Curva de Sobrevivência. Os resultados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. A curva de sobrevivência foi analisada pelo teste de Chi-quadrado e a variação do peso corporal e escore corporal pelo teste One-Way ANOVA e pós-teste de múltipla comparação de Bonferroni.*: Denota diferença estatística significativa entre os grupos estudados em comparação ao grupo animais infectados (p<0.05).

5.5 EtOHAm apresenta atividade antiparasitária em camundongos infectados

Para investigar o efeito do EtOHAm e suas frações durante a infecção por *T. gondii* *in vivo*, quantificamos a carga parasitária tecidual pelo método de imunohistoquímica (IH), de camundongos infectados e tratados durante 7 dias após a infecção. Essa análise foi realizada no intestino delgado, pulmão e fígado na fase aguda, assim como no cérebro na fase crônica.

Na fase aguda, a contagem dos taquizoítos (exemplificado na imagem da Fig. 8A), os animais submetidos ao tratamento com sulfadiazina apresentaram uma redução significativa no parasitismo quando comparados aos camundongos infectados e não tratados em todos os órgãos analisados (Fig. 8A-C, p<0,05). No intestino delgado e no pulmão, os camundongos tratados com o EtOHAm a 2,5 ou 5 mg/animal/dia apresentaram uma diminuição na carga parasitária quando comparados aos animais infectados e não tratados (Fig. 8A-B; p<0.05). Contudo, o tratamento com 10 mg de EtOHAm não alterou o parasitismo nesses sítios de infecção. De forma interessante, no fígado dos animais infectados o tratamento com 5 ou 10 mg, de EtOHAm foi capaz de diminuir a replicação de *T. gondii*, enquanto que os camundongos tratados com o EtOHAm a 2,5 mg apresentaram uma tendência em diminuir o parasitismo, não sendo estatisticamente diferente do grupo controle.

Quanto às frações de EtOHAm, tanto HexAm e o CH₂Cl₂Am não foram capazes de controlar a carga parasitária no tecido intestinal e pulmonar (Fig. 8A, B). Além disso, no intestino delgado, o tratamento com 5 mg de fração HexAm ou CH₂Cl₂Am favoreceu a proliferação de *T. gondii*. De forma semelhante, camundongos tratados com fração EtOAcAm ou HexAm a 2,5 mg/animal/dia apresentaram maior parasitismo no pulmão que os demais grupos infectados. No tecido hepático, apenas o grupo tratado com a fração CH₂Cl₂Am a 5 mg/animal/dia, apresentou parasitismo semelhante ao grupo controle (Fig. 8C).

Na fase crônica da infecção, a contagem de cistos teciduais (exemplificado na imagem da Fig.8D), semelhante à fase aguda, o grupo tratado com sulfadiazina apresentou acentuada

D

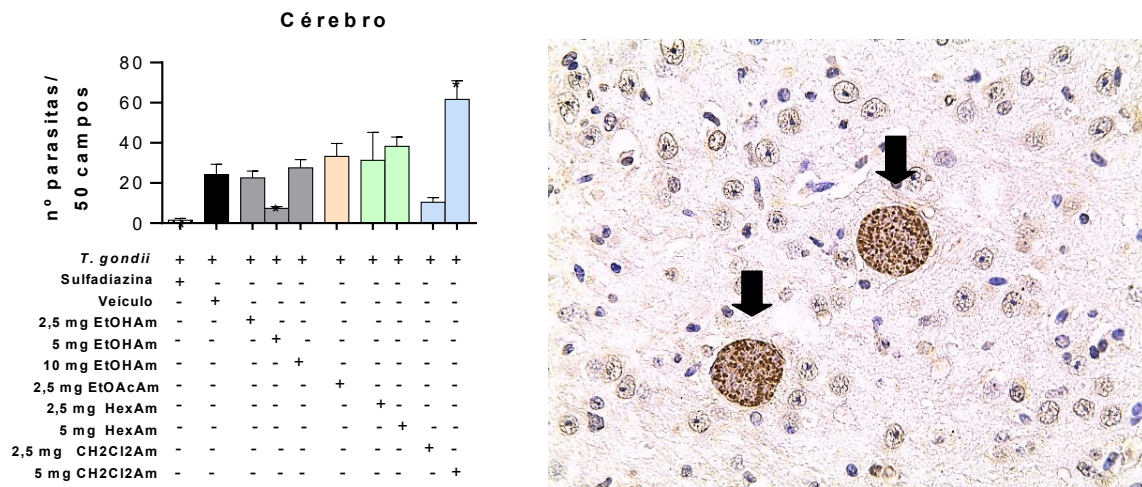


Figura 8 - Quantificação de *T. gondii* nos tecidos de camundongos infectados e tratados com extrato da *A. muricata* (AM) e suas frações. O parasitismo dos animais infectados com 20 cistos via gavagem e tratados ou não com diferentes concentrações do extrato bruto da *A. muricata* (EtOHAm) e suas frações EtOAcAm, CH₂Cl₂Am e HexAm por 7 dias, foi quantificado pelo método de imunohistoquímica. O grupo veículo foi constituído por animais infectados e não tratados, apenas com 12% DMSO/PBS, o grupo sulfadiazina foi constituído por animais infectados e tratados com sulfadiazina. **A)** Quantificação do parasitismo intestinal - Imagem representativa da marcação de taquizoito no tecido intestinal; **B)** Quantificação do parasitismo pulmonar; **C)** Quantificação do parasitismo hepático; **D)** Quantificação do parasitismo cerebral - Imagem representativa da marcação de cisto tecidual no tecido cerebral. Os resultados foram expressos pela média \pm SEM e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA e pelo pós-teste de múltipla comparação de Bonferroni. *: Denota diferença estatística significativa entre os grupos estudados em comparação ao grupo veículo ($p < 0.05$).

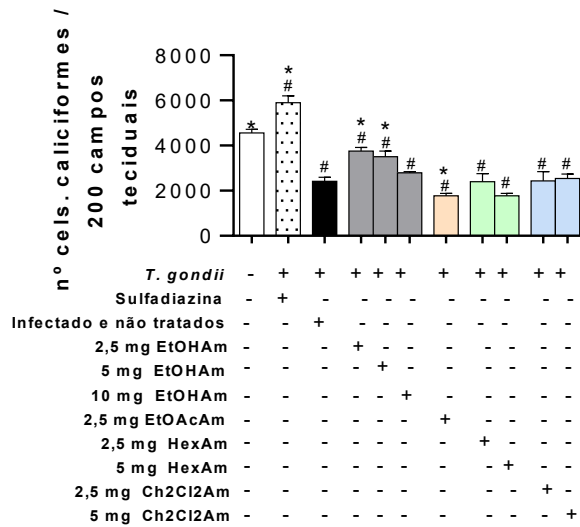
5.6 EtOHAm preserva células caliciformes no intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii*

Outro objetivo do nosso estudo foi quantificar o número de células caliciformes (exemplificada na imagem da Fig.8) e de Paneth, por serem tipos celulares presentes no epitélio intestinal e de importância na manutenção da homeostase desse órgão.

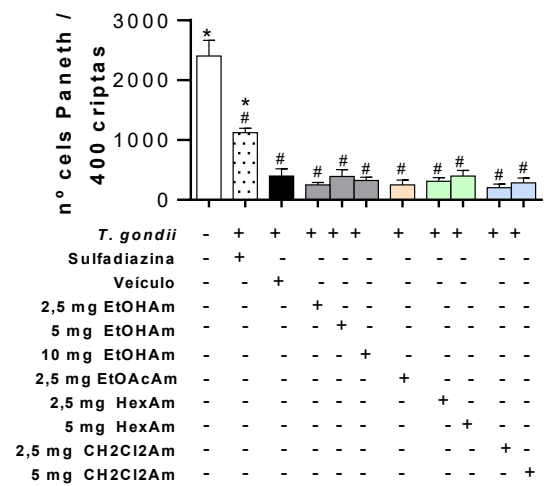
A infecção por *T. gondii* apresentou capacidade de diminuir ambos os tipos celulares (Fig. 9A-B, $p < 0,05$). Com relação às células caliciformes, quando os camundongos foram tratados com EtOHAm a 2,5 e 5 mg/animal/dia, estes apresentaram um maior número dessas células do que os camundongos infectados (Fig. 9A, $p < 0,05$). De forma contrária, o grupo tratado com a fração EtOAcAm a 2,5 mg/animal/dia apresentou um número reduzido de células caliciformes quando comparado aos animais infectados (Fig. 9A, $p < 0,05$). Além disso, o grupo tratado com sulfadiazina apresentou um aumento das células caliciformes quando comparado ao grupo infectado (Fig. 9A).

Ao analisarmos as células de Paneth, verificamos que a infecção diminuiu a quantidade dessas células no intestino delgado, independentemente do tratamento com EtOHAM ou suas frações. Entretanto, o grupo tratado com a sulfadiazina preservou parcialmente o número desse tipo celular (Fig. 9B, $p < 0,05$).

A



B



C

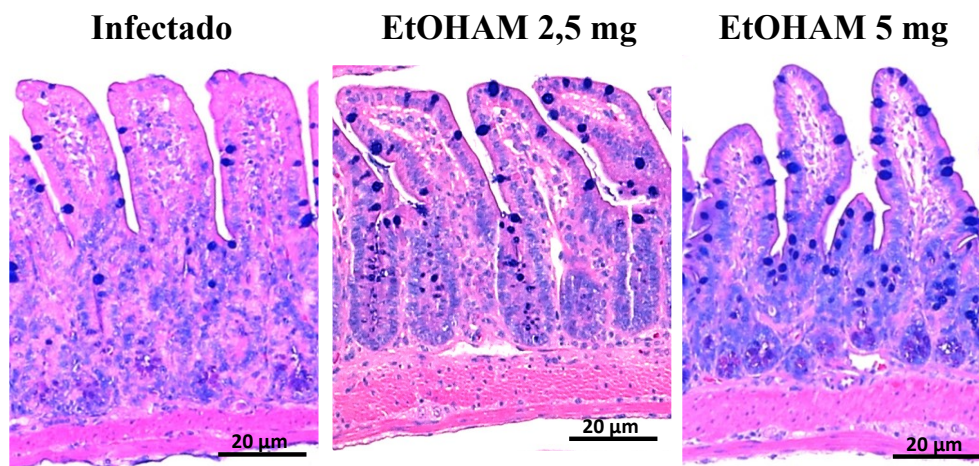


Figure 9. Quantificação das células Caliciformes e de Paneth no tecido intestinal de camundongos infectados com *T. gondii* e tratados com os extratos da *Annona muricata* (AM) e suas frações. Células Caliciformes foram quantificadas no tecido intestinal utilizando o método de coloração por Alcian blue e as células de Paneth pelo método de coloração por Hematoxilina & Eosina nos animais com 8 dias de infecção que foram tratados por 7 dias com sulfadiazina ou com extrato bruto etanólico da *A. muricata* (EtOHAM) e as frações EtOAcAm, CH₂Cl₂Am e HexAm. O grupo veículo foi constituído por animais infectados e não tratados, e o grupo controle por animais tratados apenas com veículo e não infectados. **A)** Quantificação das células Caliciformes; **B)** Quantificação das células de Paneth; **C)** Imagem histológica representativa das células caliciformes. Os resultados foram expressos pela média \pm SEM e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Imagem de cortes histológicos demonstrando as células caliciformes marcadas. Os

dados foram analisados pelo teste One-Way ANOVA e pós-teste de múltipla comparação de Bonferroni. *: Denota diferença estatística entre os grupos estudados em comparação o grupo veículo ($p < 0.05$). #: Denota diferença estatística entre os grupos estudados em comparação ao grupo não infectado ($p < 0.05$).

5.7 Mensuração de TGP no soro e análise patológica pulmonar e hepático de animais infectados com *T. gondii* e tratados com EtOHAm e frações

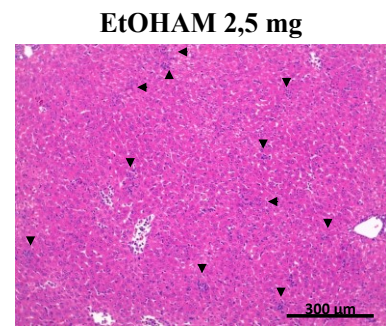
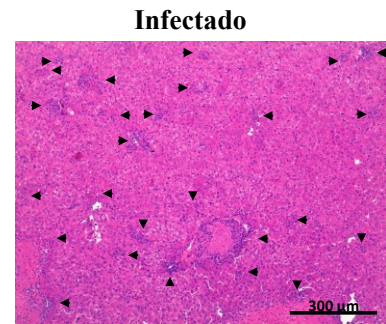
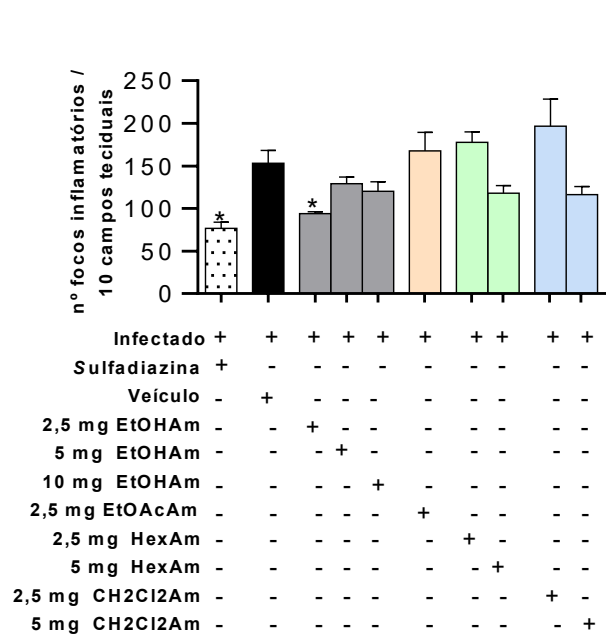
Outro aspecto que consideramos de importância para análise do efeito dos tratamentos frente à infecção foi a análise da patologia dos órgãos.

No fígado, realizamos a contagem dos focos inflamatórios (imagem representada na Fig. 10A), foi observado que, assim como o tratamento com sulfadiazina, o tratamento com EtOHAm a 2,5 mg/animal/dia foi capaz de diminuir o número de focos inflamatórios (Fig. 10A, $p < 0,05$). Entretanto, o tratamento com o EtOHAm ou suas frações não é capaz de controlar a inflamação ocasionada pela infecção por *T. gondii* no pulmão (imagem representada na Fig.10 B). Ainda, os animais tratados com EtOHAm a 10 mg/animal/dia ou com a fração EtOAcAm a 2,5 mg/animal/dia apresentaram um espessamento dos septos pulmonares, sugerindo uma maior inflamação nesse tecido.

Além disso, em relação a lesões hepáticas induzidas pela infecção, realizamos a dosagem sorológica da atividade da enzima transaminase pirúvica (TGP), como um marcador de dano hepático. A infecção por *T. gondii* aumentou os níveis séricos dessa enzima, contudo não apresentou diferença estatística (Fig. 11A, $p < 0,05$). De forma interessante, apenas o grupo tratado com EtOHAm a 2,5 mg/animal/dia apresentou diminuição dos níveis de TGP aos 8 dias de infecção em relação ao grupo de animais infectados (Fig. 11A, $p < 0,05$).

Aos 30 dias de infecção, os níveis séricos de TGP dos camundongos infectados foram semelhantes aos dos camundongos não infectados. Entretanto, tais níveis foram reduzidos diante do tratamento com sulfadiazina e aumentados quando os camundongos infectados foram tratados com as frações HexAm a 5 mg/animal/dia e CH₂Cl₂Am a 5 mg/animal/dia (Fig. 11B).

A



B

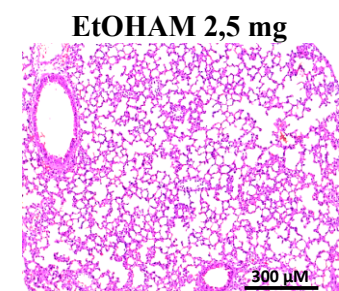
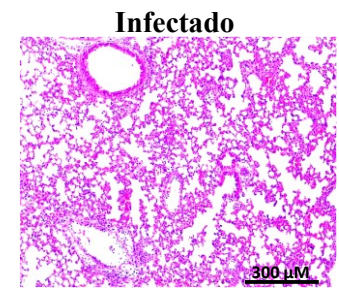
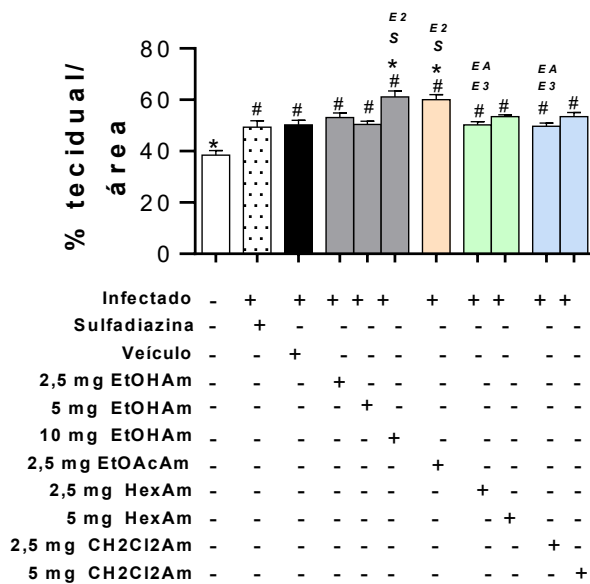


Figura 10 - Análises da patologia dos tecidos hepático e pulmonar dos animais infectados por *T. gondii* e tratados com extrato da *Annona muricata* (AM) e suas frações. A patologia do tecido hepático foi avaliada pela quantificação do número de focos inflamatórios e para o tecido pulmonar foi pela estimativa da relação da área do parênquima. Ambos tecidos foram corados com Hematoxilina & Eosina de animais não infectados e

animais aos 8 dias de infecção e que foram tratados ou não durante 7 dias com sulfadiazina ou via gavagem com o extrato bruto da *A. muricata* (EtOHAm = EExTAM) e suas frações EtOAcAm (AcEt), CH₂Cl₂Am (D) e HexAm (H). O grupo veículo foi constituído por animais infectados e não tratados. **A)** Patologia do tecido hepático; Imagem representativa do corte histológico hepática, demonstrando os focos inflamatórios (cabeça da seta); **B)** Patologia do tecido pulmonar; Imagem representativa do corte histológico pulmonar, demonstrando inflamação tecidual. Os resultados foram expressos pela média \pm SEM e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA e pós-teste de múltipla comparação de Bonferroni. *: Denota diferença estatística entre os grupos estudados em comparação ao grupo veículo ($p < 0.05$). #: Denota diferença estatística significativa entre os grupos estudados em comparação ao grupo não infectado ($p < 0.05$).

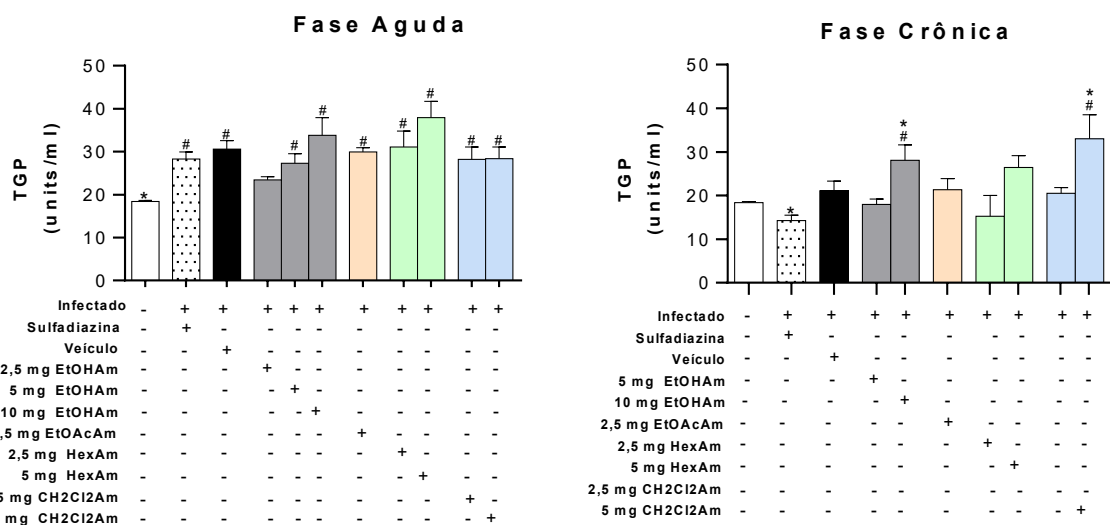
A**B**

Figura 11 - Mensuração da enzima transaminase pirúvica (TGP) no soro de animais após 8 e 30 dias de infecção por *T. gondii* e tratados com extrato da *Annona muricata* (AM) e suas frações. A dosagem sorológica da enzima transaminase pirúvica (TGP) foi quantificada por método colorimétrico (Kit TGP - Labtest). Foi coletado o soro de animais não infectados e animais com 8 dias de infecção e que foram tratados ou não durante 7 dias com sulfadiazina ou via gavagem com o extrato bruto da *A. muricata* (EtOHAm) e suas frações EtOAcAm, CH₂Cl₂Am e HexAm para análise de TGP. O grupo veículo foi constituído por animais infectados e não tratados. **A)** Dosagem de TGP aos 8 dias de infecção; **B)** Dosagem de TGP aos 30 dias de infecção. Os resultados foram expressos pela média \pm SEM e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA e pós-teste de múltipla comparação de Bonferroni. *: Denota diferença estatística entre os grupos estudados em comparação ao grupo veículo ($p < 0.05$). #: Denota diferença estatística significativa entre os grupos estudados em comparação ao grupo não infectado ($p < 0,05$).

5.8 O tratamento de camundongos com EtOHAm interfere nos níveis séricos de citocinas no soro de camundongos infectados com *T. gondii*

Avaliamos também a ação do tratamento com extrato bruto etanólico na produção das citocinas IL-10 e TGF- β , IFN- γ e TNF em amostras de soro de camundongos aos 8 dias de infecção com *T. gondii*.

A infecção por *T. gondii* aumentou a produção de IFN- γ aos 8 dias de inoculação do parasito em todas as condições experimentais (Fig. 12A, $p < 0,05$). No entanto, o tratamento com o EtOHAM, foi capaz de diminuir a produção dessa citocina em relação aos animais apenas infectados e não tratados, independente da concentração administrada (Fig. 12A, $p < 0,05$). A infecção aumentou os níveis de TNF no soro de animais não tratados com extrato de *A. muricata* (Fig. 12B, $p < 0,05$), no entanto, os grupos tratados com EtOHAM a 2,5 e 5 mg/animal/dia apresentaram níveis séricos similares ao grupo não infectado (Fig. 12B, $p < 0,05$). Contudo, tal efeito não foi observado mediante o tratamento com EtOHAM a 10 mg/animal/dia (Fig. 12B).

Ainda, observamos que a infecção por *T. gondii* resulta no aumento dos níveis de IL-10 (Fig. 12C, $p < 0,05$). Porém, quando os animais são tratados com EtOHAM, nas diferentes concentrações, os níveis séricos de IL-10 são semelhantes aos dos camundongos não infectados (Fig. 12C, $p < 0,05$). Embora não estatisticamente significativa, a infecção por *T. gondii* aumentou a produção de TGF- β , porém quando os animais foram infectados e tratados com EtOHAM esse aumento foi significativo (Fig 11D, $p < 0,05$).

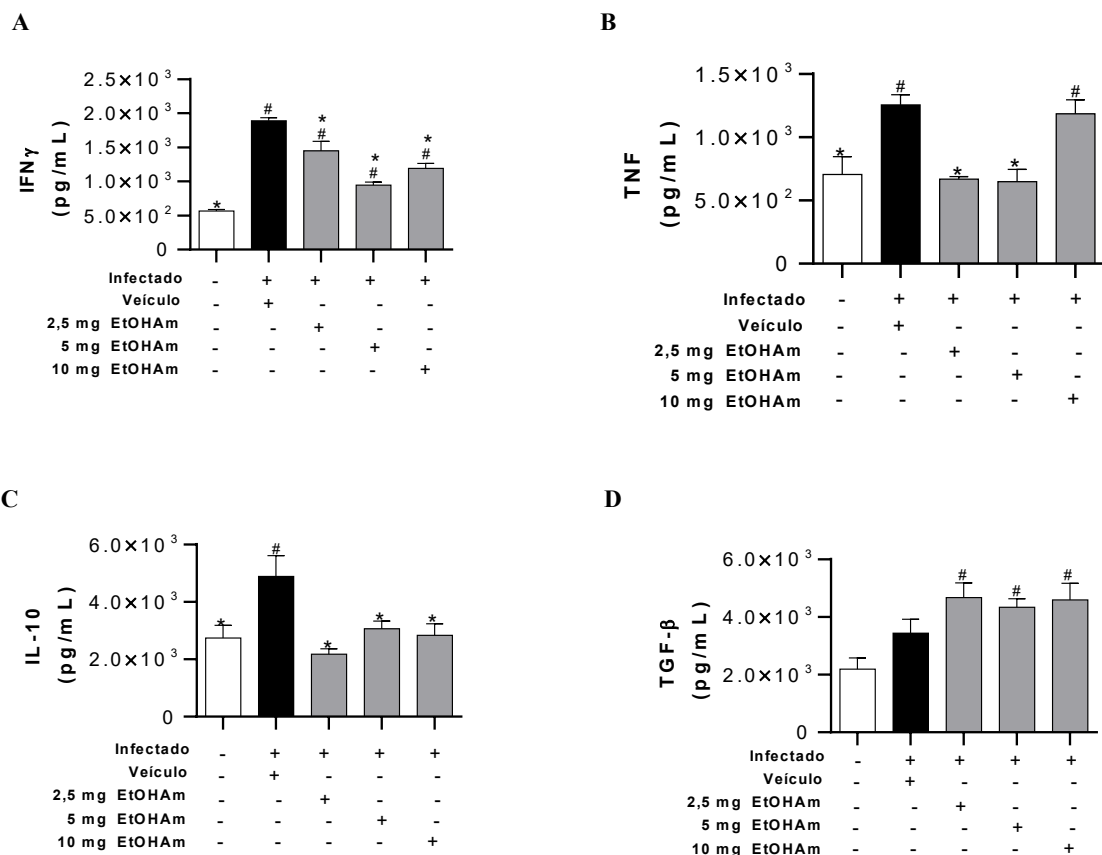


Figura 12 - Perfil de citocinas mensurado no soro de animais infectados com *T. gondii* tratados com extrato bruto de *Annona muricata* (AM). A produção de citocinas foi analisada no soro de animais infectados

com *T. gondii* tratados ou não com diferentes concentrações de extratos etanólicos brutos da *A. muricata* (EtOHAm) via gavagem, após 8 dias de infecção. Os níveis de IFN- γ , TNF, IL-10 e TGF- β foram mensurados por ELISA e estão representados nos gráficos A, B, C e D, respectivamente. Os resultados são expressos como média \pm SEM. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA e pós-teste de múltipla comparação de Bonferroni. *: Indica diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados em comparação com o controle ($p < 0,05$). #: Denota diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados em comparação com o grupo não infectado ($p < 0,05$).

5.9 O tratamento com EtOHAm influencia o perfil sérico de lipídios de camundongos infectados com *T. gondii*

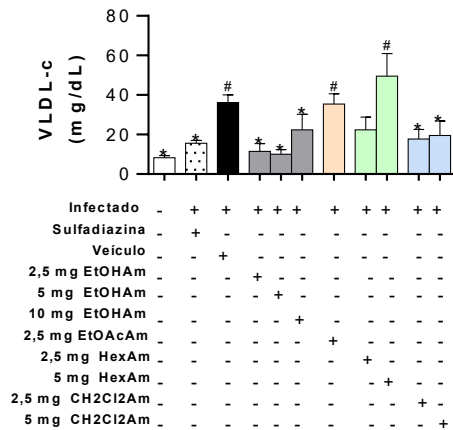
Sabemos que o parasito *T. gondii* não produz seu próprio lipídio, necessitando assim do hospedeiro para sua aquisição (COPPENS et al., 2000). A partir deste conhecimento, mensuramos os níveis de lipídios (colesterol, triglicerídeos, HDL-c, LDL-c e VLDL-c) sistemicamente nas fases aguda e crônica da toxoplasmose experimental.

Na fase aguda, com exceção de HDL-c, a infecção por *T. gondii* alterou o perfil lipídico dos camundongos, uma vez que aqueles infectados e não tratados apresentaram altos níveis de lipídicos quando comparados aos camundongos não infectados (Fig. 13, $p < 0,05$). Com relação aos níveis de colesterol, os grupos tratados com as frações HexAm e CH₂Cl₂Am a 2,5 mg/animal/dia não alteraram a produção desse lipídio quando comparados ao grupo de animais não infectados, embora apenas o tratamento com a fração HexAm a 2,5mg tenha sido estatisticamente significante (Fig. 13A, $p < 0,05$). Os níveis de triglicerídeos dos animais infectados e tratados com sulfadiazina não foram alterados aos 8 dias de infecção, assim como quando foram tratados com EtOHAm, independente da concentração, e com a fração CH₂Cl₂Am a 2,5 mg/animal/dia (Fig. 13B, $p < 0,05$). De forma semelhante, o tratamento com sulfadiazina, EtOHAm e ambas as doses de CH₂Cl₂Am não foi capaz de alterar os níveis séricos de VLDL-c nos animais infectados (Fig. 13C, $p < 0,05$).

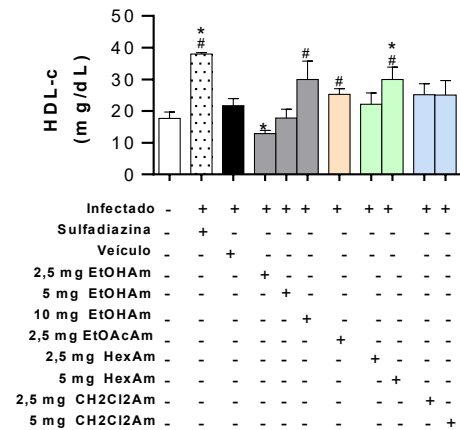
Quanto ao HDL-c, os grupos tratados com sulfadiazina, EtOHAm a 10 mg/animal/dia, frações EtOAcAm a 2,5 mg/animal/dia e HexAm a 5 mg/animal/dia apresentaram aumento nos níveis séricos quando comparados aos animais não infectados (Fig. 13C, $p < 0,05$). Já o tratamento com EtOHAm a 2,5 mg/animal/dia foi capaz de reduzir os níveis de HDL-c quando comparados aos camundongos infectados e não tratados (Fig. 13C, $p < 0,05$).

Os grupos tratados com EtOHAm a 2,5 e 5 mg/animal/dia e com as frações HexAm a 5 mg/animal/dia e CH₂Cl₂Am 2,5 e 5 mg/animal/dia apresentaram aumento nos níveis de LDL-c quando comparados aos animais não infectados (Fig. 13D, $p < 0,05$). Por outro lado, os grupos tratados com sulfadiazina e com a fração HexAm a 2,5 mg/animal/dia apresentaram

C



D



E

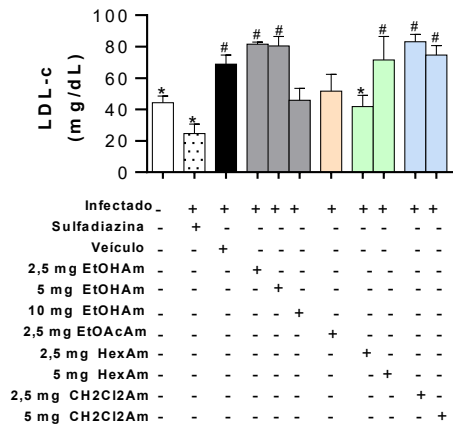


Figura 13 - Perfil lipídico mensurado no soro de animais após 8 dias de infecção por *T. gondii* e tratados com extrato de *Annona muricata* (AM) e suas frações. Produção dos lipídios foi analisada no soro de animais não infectados e infectados por *T. gondii* tratados com sulfadiazina ou via gavagem com diferentes concentrações do extrato bruto etanólico da *A. muricata* (EtOHAm) e suas frações EtOAcAm, CH₂Cl₂Am e HexAm após 8 dias de infecção. O grupo veículo foi constituído por animais infectados e não tratados e o grupo de animais não infectados. Os níveis do colesterol total, triglicerídeos, VLDL-c, HDL-c e LDL-c são mostrados em gráficos identificados como **A**, **B**, **C**, **D** e **E**, respectivamente. Resultados são expressos pela média \pm SEM. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA e pós-teste de múltipla comparação de Bonferroni. *: Denota diferença estatística significativa entre os grupos estudados em comparação com o grupo veículo ($p < 0.05$). #: Denota diferença estatística significativa entre os grupos estudados em comparação com o grupo não infectado ($p < 0.05$).

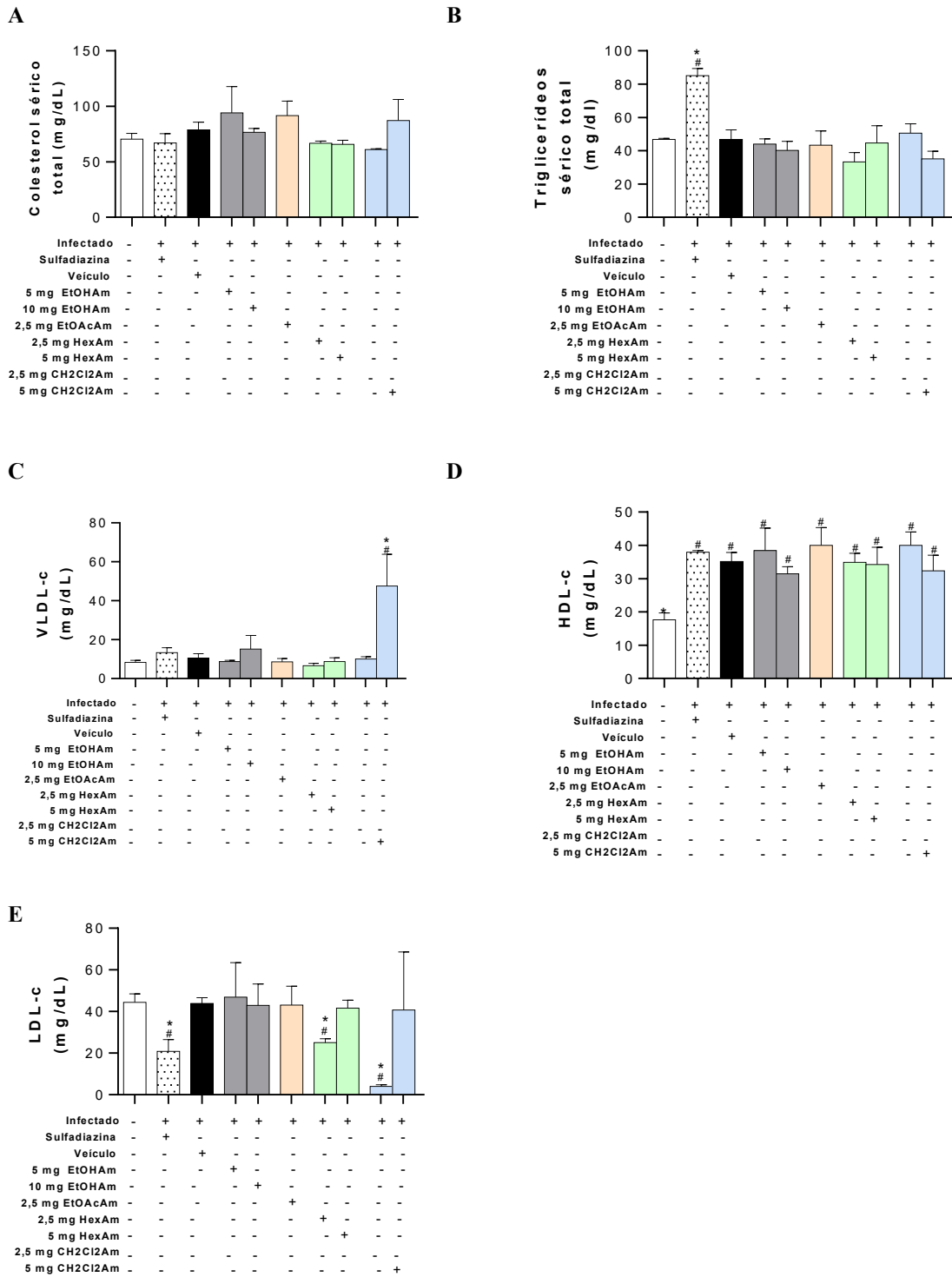


Figura 14 - Perfil lipídico mensurado no soro de animais após 30 dias de infecção por *T. gondii* e tratados com extrato da *Annona muricata* (AM) e suas frações. A produção dos lipídios foi analisado no soro de animais não infectados e infectados por *T. gondii* tratados com sulfadiazina ou via gavagem com diferentes concentrações do extrato bruto etanólico da *A. muricata* (EtOHAm) e suas frações EtOAcAm, CH2Cl2Am e HexAm após 30 dias de infecção. O grupo veículo foi constituído por animais infectados e não tratados, apenas com veículo e o grupo de animais não infectados. Os níveis do colesterol total, triglicerídeos, VLDL-c, HDL-c e LDL-c e são mostrados em gráficos identificados como **A**, **B**, **C**, **D** e **E**, respectivamente. Resultados são expressos pela média \pm SEM. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA e pós-teste de múltipla comparação de Bonferroni. *: Denota diferença estatística significativa entre os grupos estudados em comparação com o grupo veículo ($p < 0.05$). #: Denota diferença estatística significativa entre os grupos estudados em comparação com o grupo não infectado ($p < 0.05$).

6 DISCUSSÃO

Uma vez que estudos prévios demonstraram que a folha de *A. muricata* (graviola) possui propriedades anti-inflamatórias (TAYLOR, 2002) e atividade contra protozoário do filo Apicomplexa (*Plasmodium falciparum*) (BIDLA et al., 2004; NGUYEN-POUPLIN et al., 2007), decidimos investigar o efeito do extrato etanólico das folhas dessa planta e de suas frações durante a infecção por *T. gondii*.

Um estudo anterior com ratos demonstrou que o extrato preparado com folha de graviola é seguro para administração, mesmo em altas concentrações (4g/kg) (MOGHADAMTOUSI et al., 2015). Demonstramos que o EtOHAm bruto e doses inferiores da fração acetato de etila, não foram tóxicas para fibroblastos murinos *in vitro*, conforme avaliado pelo ensaio MTT. De forma semelhante, outro estudo também avaliou a citotóxicidade do extrato da fruta da graviola na mesma linhagem celular (fibroblasto NIH/3T3) pelo método do cristal violeta e não foi observado efeito citotóxico nessas células, corroborando com os resultados aqui apresentados (ZAMUDIO-CUEVAS et al., 2013).

Após verificação da segurança em utilizar o EtOHAm bruto e suas frações, investigamos o efeito de *A. muricata* na replicação de *T. gondii in vitro*. Nossos resultados demonstraram a efetiva atividade inibitória do EtOHAm na proliferação de *T. gondii* nos fibroblastos NIH/3T3 e macrófagos J774, sugerindo uma atividade anti-*Toxoplasma* desse extrato. Da mesma forma, estudos anteriores por meio de ensaios *in vitro*, mostraram que o extrato da graviola apresentou atividade antiparasitária contra *P. Falciparum*, outro parasita do filo Apicomplexa (BIDLA et al., 2004; NGUYEN-POUPLIN et al., 2007).

A atividade antiparasitária das frações de *A. muricata* foi demonstrada em estudos anteriores. As frações de metanol (MeOH), diclorometano (DCM/CH₂Cl₂Am) e aquosa (H₂O) de *A. muricata* apresentaram atividade antiplasmodial contra *P. falciparum* resistente à cloroquina (MOHD ABD RAZAK et al., 2014). Além disso, o extrato de acetato de etila da folha possui atividade anti-*Trypanosoma* e anti-*Leishmania* (OSORIO et al., 2007). No presente estudo, os experimentos *in vitro* demonstraram que as frações hexAm, CH₂Cl₂Am e EtOAc controlam a replicação de *T. gondii* em fibroblastos murinos nas concentrações que não foram consideradas citotóxicas. No entanto, as frações BuOH e aquosa, não demonstraram nenhum tipo de ação anti-*Toxoplasma*. Já nos testes *in vivo*, os extratos das frações hexAm ou CH₂Cl₂Am não foram capazes de controlar o parasita pela análise do parasitismo intestinal, indicando que esses compostos não são eficientes em nosso modelo experimental ou que as doses devem ser ajustadas para o controle da replicação de *T. gondii*.

As frações da *A. muricata* possuem diferentes efeitos antiparasitários, dependendo da espécie do parasito. Além disso, os dados sugerem que os efeitos anti-*Toxoplasma* do EtOHAm resultam da atividade sinérgica dos seus metabólitos (alcaloides, flavonoides, polifenóis, saponinas, kaempferol e acetogenina) (MATSUSHIGE et al., 2012; GEORGE et al., 2015; MOGHADAMTOUSI et al., 2015; YANG et al., 2015), e com a partição de seus componentes, esse efeito pode ter sido parcialmente reduzido.

Sabe-se que um dos mecanismos de controle de *T. gondii* mediado por IFN- γ é através da produção de óxido nítrico (NO) (ADAMS et al., 1990), e a síntese de NO resulta em privação de arginina que bloqueia eficientemente a replicação de *T. gondii* (FOX; GIGLEY; BZIK, 2004). Ainda, durante a síntese de NO por óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), a replicação do parasita é eficientemente bloqueada (FOX; GIGLEY; BZIK, 2004). Estudos anteriores *in vitro* demonstraram que o extrato de graviola induz a produção de NO em macrófagos RAW 264.7 (KIM et al., 2016). De forma semelhante, os resultados obtidos na presente investigação mostraram que os níveis de NO são aumentados diante do tratamento com EtOHAm. Sendo assim, nossos dados sugerem que o controle da proliferação de *T. gondii* nos macrófagos J774 pelo EtOHAm se deve pela indução da produção de NO. Estudos adicionais são necessários para investigar o mecanismo de controle do parasito em fibroblastos murinos.

Nossos resultados *in vivo* confirmaram os achados *in vitro*, demonstrando a atividade anti-*Toxoplasma* do EtOHAm em camundongos infectados. Foi observada uma maior taxa de sobrevivência nos camundongos C57BL/6 infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* tratados com EtOHAm em comparação com camundongos infectados não tratados. Além disso, o tratamento com extrato diminuiu o parasitismo nas doses de 2,5 e 5 mg no intestino e pulmão na fase aguda, bem como a replicação do parasito no cérebro na dose de 5mg durante a fase crônica. Da mesma forma, o extrato aquoso de folhas de *A. muricata* prolongou a taxa de sobrevivência e reduziu a parasitemia de camundongos infectados com a cepa ANKA de *P. berghei* (SOMSAK; POLWIANG; CHACHIYO, 2016). Além do controle de parasitos, foi observado que as folhas de *A. muricata*, para alguns tipos de células cancerígenas, possui potencial anticancerígeno, diminuindo a viabilidade celular frente ao tratamento (KIM et al., 1998; TORRES et al., 2012; YANG et al., 2015).

As respostas imune inata (revisado por YAROVINSKY, 2014) e adaptativa são necessárias para a resistência ao *T. gondii* (SUZUKI et al., 1988). O reconhecimento de *T. gondii* pelas células dendríticas induz a produção de IL-12 que tem um papel essencial no desenvolvimento da resposta imune tipo 1, que levam a produção de IFN- γ e TNF

(GAZZINELLI et al., 1993). Embora o desenvolvimento de uma resposta Th1 seja essencial para proteção contra a toxoplasmose (MCSORLEY & BEVINS, 2013), em camundongos uma resposta imunológica exacerbada aumenta a mortalidade, ocasionada pelo desenvolvimento de lesões intestinais graves dependentes de células T CD4⁺ e alta produção de IFN- γ , TNF e NO (LIESENFELD et al., 1996, 1999). Estudos prévios mostraram que a graviola apresenta propriedades anti-inflamatórias por meio da inibição de COX-1 e 2 *in vitro* (ISHOLA et al., 2014), como também a capacidade em estimular o sistema imune inato, uma vez que o tratamento de macrófagos RAW 264.7 com o extrato de graviola resultou no aumento das concentrações de NO, TNF e IL-1 β em seus sobrenadantes (KIM et al., 2016). Entretanto, nossos resultados mostraram que o tratamento com EtOHAm diminuiu os níveis séricos de IFN- γ , TNF e IL-10 dos camundongos infectados com *T. gondii*. Ainda, os níveis de TNF desses animais foram semelhantes ao grupo não infectado, quando os animais foram tratados com 2,5 ou 5mg de EtOHAm. Sendo assim, o tratamento com EtOHAm pode ter controlado uma resposta imune exacerbada, aumentando o tempo de sobrevivência dos animais infectados.

A homeostase intestinal depende da cooperação de vários tipos celulares no epitélio intestinal com células imunes locais e a microbiota intestinal. O epitélio é composto de enterócitos absorptivos, juntamente com células de Paneth, calciformes, *tuft* e enteroendócrinas, que apresentam um papel importante na barreira mecânica entre as populações bacterianas intestinais residentes e hospedeiras e também contra o meio ambiente, contribuindo com a manutenção da integridade do epitélio intestinal (DE SANTIS et al., 2015; PETERSON; ARTIS, 2014). Portanto, por ser o intestino delgado um importante sítio de infecção durante a infecção oral por *T. gondii*, e as células apresentarem grande importância na homeostase intestinal, surgiu o interesse em conhecer o efeito do tratamento com EtOHAm e frações da graviola nessas células.

As células calciformes no epitélio intestinal são responsáveis pela produção e liberação de mucinas que, ao entrarem em contato com a água, formam o muco, criando um filme lubrificante e protetor para o epitélio intestinal contra agressores químicos, físicos e biológicos (DEPLANCKE; GASKINS, 2001). Dessa forma, é um constituinte da barreira intestinal, sendo a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores (revisado MONCADA; KAMMANADIMINTI; CHADEE, 2003), como a enterobactéria *Yersinia enterocolitica* (MANTLE et al., 1989) e rhesus rotavírus (RRV) (CHEN; BAYLOR; BASS, 1993). Em resposta ao *T. gondii*, galinhas infectadas com oocistos apresentam hiperplasia de células calciformes no intestino (SHIRAISHI et al., 2009). De forma

semelhante ratos infectados com oocistos apresentaram aumento quantitativo de células caliciformes na fase aguda da infecção (TREVIZAN et al., 2016). A infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* em camundongos, também resulta no aumento do número de células caliciformes no intestino; porém, a coinfeção com cistos de *T. gondii* por via oral diminui os números desse fenótipo celular (LIESENFELD; DUNAY; ERB, 2004). As diferenças observadas nos diferentes estudos podem estar relacionadas ao estágio do parasita utilizado para infectar os animais, às diferentes espécies de animais analisados e também à metodologia utilizada para contagem de células caliciformes. De forma semelhante ao nosso achado, estudo com a bactéria *Citrobacter rodentium*, demonstrou um decréscimo no número de células caliciformes, sendo este modulado principalmente pelo sistema imune, através dos linfócitos T e B (BERGSTROM et al., 2008). De maneira interessante, na presente investigação, os animais tratados com EtOHAM apresentaram maior quantidade de células caliciformes no intestino delgado em comparação com camundongos infectados não tratados. Foi previamente verificado que camundongos infectados com *Citrobacter rodentium* apresentam colite com depleção de células caliciformes e que a depleção dessas células é dependente de células T CD4 e produção de IFN- γ (CHAN et al., 2013). Uma vez altos níveis de IFN- γ e TNF induzem maior imunopatologia no intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* (LIESENFELD et al., 1996), a modulação negativa da resposta Th1 pelo EtOHAM poderia estar envolvida na redução das alterações inflamatórias no intestino delgado, contribuindo assim para a preservação das células caliciformes e para a proteção dos camundongos contra a infecção por *T. gondii*.

As células de Paneth são importantes células epiteliais secretoras, encontradas na base das criptas intestinais no intestino delgado que produzem peptídeos antimicrobianos (CLEVERS; BEVINS, 2013) tais como lisozima e α -defensinas, que poderiam proteger o hospedeiro contra bactérias entéricas patogênicas e moldar a composição da microbiota colonizando o intestino delgado (MCSORLEY & BEVINS, 2013; SALZMAN; UNDERWOOD; BEVINS, 2007; SALZMAN et al., 2010).

A célula de Paneth requer a presença do cofator da E3ligase Hrd1 (Sell1L), pois foi observado que camundongos deficientes em Sell1L apresentam perda desta linhagem celular ao ser infectado por *T. gondii* (SUN et al., 2016). A sinalização da IL-1 contribui para a resposta inflamatória exacerbada em camundongos C57BL/6 infectados por via oral com *T. gondii* com aumento de IFN- γ (VILLERET et al., 2013) e depleção de células de Paneth (VILLERET et al., 2013; FARIN et al., 2014; RAETZ et al., 2013). Experimentos *in vivo* com *T. gondii* revelaram que a perda de células de Paneth característica da resposta ao parasito,

juntamente com grave inflamação induz disbiose intestinal (BELKAID; HAND, 2014; RAETZ et al., 2013). Da mesma forma, em nosso trabalho experimental, observou-se uma diminuição no número de células de Paneth durante a infecção oral por *T. gondii*, contudo os tratamentos com EtOHAM e suas frações não alteraram sua redução. Sendo assim, os efeitos benéficos do extrato são independentes das células de Paneth e seus produtos.

O colesterol (Chl) é um esteroide encontrado nas membranas celulares e transportado no plasma sanguíneo de todos os animais. É um componente essencial das membranas celulares de mamíferos. As células periféricas obtêm o colesterol através da síntese local e da absorção de lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL). Por outro lado, o Chl do tecido é transportado das células periféricas através do compartimento do plasma de volta ao fígado na forma de lipoproteína de alta densidade (HDL) (revisado por FIELDING; FIELDING, 1995). *Toxoplasma gondii* não é capaz de sintetizar esteróis, colesterol e, portanto, depende da captação destes lipídios do hospedeiro para seu próprio desenvolvimento (COPPENS; SINAI; JOINER, 2000) via endocitose mediada pelo receptor de LDL (COPPENS; SINAI; JOINER, 2000; COPPENS, 2006) ou provavelmente também através da proteína relacionada ao receptor de LDL (ISHIBASHI et al., 1993). O colesterol é importante para os estágios de aderência, penetração e multiplicação intracelular do *T. gondii* (COPPENS; JOINER, 2003). No presente estudo, observou-se que, em animais infectados com *T. gondii*, o colesterol total, triglicérides, VLDL-c e o LDL-c aumentaram sistemicamente no dia 8 após a infecção ao serem comparados com animais não infectados. Foi anteriormente observado que camundongos Swiss-Webster infectados com 8 cistos da cepa GD-1 apresentaram redução nos níveis de colesterol e HDL no dia 14 p.i., mas níveis normais na fase crônica da infecção, dia 42 p.i. (MILOVANOVIĆ et al., 2017). A diferença observada entre os nossos resultados pode ser devido a diferentes linhagens de camundongos, cepa do parasita utilizada nos experimentos e também pelo dia da mensuração lipídica. Semelhante aos nossos resultados, um estudo com *Chlamydia pneumonia*, demonstrou que a infecção por essa bactéria é capaz de aumentar os níveis de colesterol e triglicérides nas amostras de soro de camundongos BALB/c e os níveis de HDL não foi alterada (MARANGONI et al., 2015). Estudo com C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA (PbA), também observou aumento dos níveis de colesterol, triglicérides e nas lipoproteínas e ao serem tratados com o extrato do fungo *Trichoderma stromaticum*, os níveis de colesterol e triglicérides reduziram (CARIACO et al., 2018). No presente estudo, foi demonstrado que os animais infectados por *T. gondii* e tratados com EtOHAM diminuíram os níveis de triglicérides e VLDL. Nesse sentido, foi previamente demonstrado que o extrato aquoso de

folhas da *A. muricata* diminuiu os níveis de colesterol total, triglicérides e LDL em um modelo experimental de Diabetes mellitus (ADEWOLE; OJEWOLE, 2010).

As membranas de *Toxoplasma* contêm colesterol que é principalmente derivado da lipoproteína de baixa densidade (LDL) internalizada nas células hospedeiras. A inibição da endocitose de LDL, com a degradação lisossômica e com a translocação do colesterol dos lisossomos bloqueia a liberação de colesterol para o vacúolo parasitóforo, reduzindo significativamente a replicação do parasita (COPPENS; SINAI; JOINER, 2000). O aumento do colesterol total, triglicérides, VLDL, LDL durante a infecção por *T. gondii* pode estar envolvido na proliferação do parasita. Os dados apresentados sugerem que a diminuição de triglicérides e VLDL e a tendência em controlar o colesterol pelo tratamento com EtOHAM em camundongos infectados com *T. gondii* contribuíram no controle de sua replicação.

De maneira geral, com os resultados obtidos por este trabalho, concluímos que o EtOHAM possui ação anti-toxoplásmica *in vitro* e *in vivo*, enquanto suas frações (hexano, acetato de etila e diclorometano) apenas apresentaram efeito *in vitro*, apresentando *in vivo* as frações hexano e diclorometano à 5 mg/animal tendência em diminuir os focos inflamatórios. O EtOHAM demonstrou atividade anti-inflamatória controlando os níveis elevados de IFN- γ e TNF sistemicamente e preservando as células caliciformes no intestino delgado, além de também diminuir os triglicérides e VLDL sistemicamente que poderiam estar envolvidos no crescimento do parasita. Portanto, essa melhora no tecido intestinal pela atividade anti-inflamatória, preservação do epitélio intestinal e controle dos níveis de triglicérides, sugerem que o EtOHAM apresenta atividade anti-Toxoplasma, possuindo potencial como medicamento para o controle de *T. gondii*. Entretanto, novos estudos são necessários para esclarecer o mecanismo de controle de *T. gondii* exercido pelo EtOHAM durante a toxoplasmose.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, M. et al. The Value of Caspase-3 after the Application of *Annona muricata* Leaf Extract in COLO-205 Colorectal Cancer Cell Line. **Gastroenterology research and practice**, v. 2017, p. 4357165, jan. 2017. DOI: 10.1155/2017/4357165,

ADAMS, L. B. et al. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 144, n. 7, p. 2725-9, abr. 1990. DOI:

ADEWOLE; CAXTON-MARTINS. Morphological changes and hypoglycemic effects of *Annona muricata* linn. (annonaceae) leaf aqueous extract on pancreatic β -cells of streptozotocin-treated diabetic rats. **African Journal of Biomedical Research**, v. 9, n. 3, 2009. DOI: 10.4314/ajbr.v9i3.48903

ADEWOLE, S.; OJEWOLE, J. Protective effects of *Annona muricata* linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 6, n. 1, 2010. DOI: 10.4314/ajtcam.v6i1.57071

ANTONY, P.; VIJAYAN, R. Acetogenins from *Annona muricata* as potential inhibitors of antiapoptotic proteins: a molecular modeling study. **Drug design, development and therapy**, v. 10, p. 1399-410, 5 jan. 2016. DOI: 10.2147/DDDT.S103216,

ASSOLINI, J. P. P. et al. Nanomedicine advances in toxoplasmosis: diagnostic, treatment, and vaccine applications. **Parasitology research**, v. 116, n. 6, p. 1603-1615, 4 jun. 2017. DOI: 10.1007/s00436-017-5458-2

BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; KUMAR, T. S. *In vitro* antioxidant studies in leaves of *Annona* species. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.45, n. 5, p. 480-485, 2007. PMID: 17569293

BASU, S. et al. DNA chip-assisted diagnosis of a previously unknown etiology of intermediate uveitis- *Toxoplasma gondii*. **Indian journal of ophthalmology**, v. 58, n. 6, p. 535-7, 5 jan. 2010. DOI: 10.4103/0301-4738.71714,

BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 121-41, 4 mar. 2014. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.011

BENOIT-VICAL et al. Anti-Toxoplasma activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine. **Parasite**, v. 7, n. 1, p. 3-7, 2000. DOI: 10.1051/parasite/2000071003

BERGSTROM, K. et al. Modulation of Intestinal Goblet Cell Function during Infection by an Attaching and Effacing Bacterial Pathogen. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 2, p. 796-811, 2008. DOI: 10.1128/IAI.00093-07

BIDLA, G. et al. Antiplasmodial activity of seven plants used in African folk medicine. **Indian Journal Pharmacology**, v. 36, n. 4, p. 244-250. 2004.

BLADER, I.; SAEIJ, J. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS**, v. 117, n. 5-6, p. 458-476, 2009. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2009.02453.x

BORIES, C. et al. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. **Planta medica**, v. 57, n. 5, p. 434-6, 2 out. 1991. DOI: 10.1055/s-2006-960143

BOSCH-DRIESEN, L. Ocular toxoplasmosis: clinical features and prognosis of 154 patients., **Ophthalmology**, v. 109, n. 5, p. 869-878, 2002.

BOUT, D., MORETTO, M., DIMIER-POISON, I. & GATEL, D.B. Interaction between *Toxoplasma gondii* and enterocyte. **Immunobiology**, v.201,n.2, p. 225-228, 1999. DOI: 10.1016/S0171-2985(99)80062-X

BROWN, R. R. et al. Feline zoonoses guidelines from the American Association of Feline Practitioners. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 7, n. 4, p. 243-74, 1 ago. 2005. DOI: 10.1016/j.jfms.2004.11.001

CARIACO, Y. et al. Ethanolic extract of the fungus *Trichoderma stromaticum* decreases inflammation and ameliorates experimental cerebral malaria in C57BL/6 mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1547, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-19840-x

CARRUTHERS, V.; SUZUKI, Y. Effects of *Toxoplasma gondii* Infection on the Brain. **Schizophrenia Bulletin**, v. 33, n. 3, p. 745-751, 2007. DOI: 10.1093/schbul/sbm008

CASTRO-FILICE, L. S. S. et al. Azithromycin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in human villous explants. **Journal of translational medicine**, v. 12, p. 132, 1 maio 2014. DOI: 10.1186/1479-5876-12-132

CHAN, J. et al. CD4+ T Cells Drive Goblet Cell Depletion during *Citrobacter rodentium* Infection. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 12, p. 4649-4658, 2013. DOI: 10.1128/IAI.00655-13. DOI: doi.org/10.1016/0016-5085(93)90013-3

CHEN, C. C.; BAYLOR, M.; BASS, D. M. Murine intestinal mucins inhibit rotavirus infection. **Gastroenterology**, v. 105, n. 1, p. 84-92, 4 jul. 1993.

CHOI, K.-M. M.; GANG, J.; YUN, J. Anti-*Toxoplasma gondii* RH strain activity of herbal extracts used in traditional medicine. **International journal of antimicrobial agents**, v. 32, n. 4, p. 360-2, 3 out. 2008. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.04.012

CHOI, W.; JIANG, M.; CHU, J. Antiparasitic effects of *Zingiber officinale* (Ginger) extract against *Toxoplasma gondii*. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 11, n. 1, p. 15-26, 2013. DOI: 10.2478/v10136-012-0014-y

CLEVERS, H. C.; BEVINS, C. L. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. **Annual review of physiology**, v. 75, p. 289-311, 2 jan. 2013. DOI: 10.1146/annurev-physiol-030212-183744

COPPENS, I. Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2006. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2005.00647.x

COPPENS, I.; JOINER, K. Host but Not Parasite Cholesterol Controls *Toxoplasma* Cell Entry by Modulating Organelle Discharge. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, n. 9, p. 3804-3820, 2003. DOI: 10.1091/mbc.e02-12-0830

COPPENS, I.; SINAI, A. P.; JOINER, K. A. *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. **The Journal of cell biology**, v. 149, n. 1, p. 167-80, 1 abr. 2000.

CZARNEWSKI, P. et al. Recombinant TgHSP70 Immunization Protects against *Toxoplasma gondii* Brain Cyst Formation by Enhancing Inducible Nitric Oxide Expression. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 142, jan. 2017. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00142

DE OLIVEIRA, T. et al. *Toxoplasma gondii*: Effects of *Artemisia annua* L. on susceptibility to infection in experimental models *in vitro* and *in vivo*. **Experimental Parasitology**, v. 122, n. 3, p. 233-241, 2009. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.04.010

DE SANTIS, S. et al. Nutritional Keys for Intestinal Barrier Modulation. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 612, 4 jan. 2015. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.04.010

D'ANDREA, A., ASTE-AMEZAGA, M., VALIANTE, N.M., MA, X., KUBIN, M. & TRICHERI, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma- production by suppressing natural killer cell stimulatory

factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **The Journal of Experimental Medicine.**, v.178, n.3, p. 1041-1048, 1993. PMID: 8102388, PMCID: PMC2191152

DEPLANCKE, B.; GASKINS, H. R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 6, p. 1131S-1141S, 5 jun. 2001. DOI: 10.1093/ajcn/73.6.1131S,

DUBEY, J. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 10191024, 1998. DOI: 10.1016/S0020-7519(98)00023-X
DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 267-99, 3 abr. 1998.

ESKILD, A. et al. Screening for toxoplasmosis in pregnancy: what is the evidence of reducing a health problem? **Journal of medical screening**, v. 3, n. 4, p. 188-194, 1996.

FARIN, H. F. et al. Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN- γ . **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 7, p. 1393-1405, 2014. DOI: 10.1084/jem.20130753

FERREIRA, L. E. et al. In vitro anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. **Experimental parasitology**, v. 134, n. 3, p. 327-32, 1 jul. 2013. DOI: 10.1016/j.exppara.2013.03.032

FIELDING, C. J.; FIELDING, P. E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. **Journal of lipid research**, v. 36, n. 2, p. 211-28, 3 fev. 1995.

FILISSETTI; SANITA, C. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 40, n. 1, p. 71-80. 2004.

FIorentino, D.F., ZLOTNIK, A., MOSMANN, T.R., HOWARD, M. & O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v.147, p. 3815-3822, 1991. PMID: 27543667

FOX, B.; GIGLEY, J.; BZIK, D. *Toxoplasma gondii* lacks the enzymes required for de novo arginine biosynthesis and arginine starvation triggers cyst formation. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 323-331, 2004. DOI: 10.1016/j.ijpara.2003.12.001

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, p. 499-805, 1972.

GAVAMUKULYA, Y. et al. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and *in vitro* anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, p. S355-S363, 2014. DOI: 10.1016/S1995-7645(14)60258-3

GAZZINELLI, R.T., OSWALD, LP., JAMES, S.L. & SHER, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. **Journal of Immunology**, v.148, n.6, p.1792-1796, 1992. PMID: 1541819

GAZZINELLI, R. T. et al. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by *in vivo* neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 151, n. 7, p. 3672-81, 5 out. 1993a.

GAZZINELLI, R.T., DENKERS, E.Y. & SHER, A. Host resistance to *Toxoplasma gondii*: Model for studying the selective induction of cell mediated immunity by intracellular parasites. **Infectious Agents and Disease.**, v. 2, n.3, p. 139-149, 1993b. PMID: 7909708

GEORGE, V. et al. Quantitative Assessment of the Relative Antineoplastic Potential of the n-butanolic Leaf Extract of *Annona Muricata* Linn. in Normal and immortalized Human Cell Lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 2, p. 699-704, 2012. DOI: 10.7314/APJCP.2012.13.2.699

GEORGE, V. et al. Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 2328-2335, 2015. DOI: 10.1007/s13197-014-1289-7

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-8, 5 out. 1982.

GUERINA, N. G., et al. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. **The New England Journal of Medicine**, 1994.

HALONEN, S.K., CHIU, F.-C. & WEISS, L.M. Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. **Infection and Immunity**, v. 66, n.10, p. 4989 - 4993, 1998. PMID: 9746608, PMCID: PMC108619

- HAMID, R. et al. Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 630-641, 2012. DOI: 10.1590/S0102-695X2012005000001
- HANSRA, D. et al. Patient with Metastatic Breast Cancer Achieves Stable Disease for 5 Years on Graviola and Xeloda after Progressing on Multiple Lines of Therapy. **Advances in Breast Cancer Research**, v. 03, n. 03, p. 84-87, 2014. DOI: 10.4236/abcr.2014.33012
- HOLLAND, G. N. et al. Intraocular inflammatory reactions without focal necrotizing retinochoroiditis in patients with acquired systemic toxoplasmosis. **American journal of ophthalmology**, v. 128, n. 4, p. 413-20, 5 out. 1999.
- ISHIBASHI, S. et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 2, p. 883-893, 1993. DOI: 10.1172/JCI116663
- ISHOLA, I. O. et al. Mechanisms of analgesic and anti-inflammatory properties of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) fruit extract in rodents. **Journal of medicinal food**, v. 17, n. 12, p. 1375-82, 1 dez. 2014. DOI: 10.1089/jmf.2013.0088
- JARAMILLO, M. C. et al. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 183-186, 2000. DOI: 10.1016/S0367-326X(99)00138-0
- JONES, J. et al. Congenital Toxoplasmosis: A Review. **Obstetric and Gynecologic Survey**, v. 56, n. 5, p. 296-305, 2001. DOI: 10.1097/00006254-200105000-00025
- JUSTINO, A. B. et al. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with *in vitro* antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 100, p. 83-92, abr. 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.172
- KAUSHIK, N. et al. Antiplasmodial potential of selected medicinal plants from Eastern Ghats of South India. **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 1, p. 2632, 2013. DOI: 10.1016/j.exppara.2013.01.021
- KIM, G. S. et al. Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 2, p. 565-71, 2 set. 1998.
- KIM, G.-T. T. et al. Immunomodulatory Efficacy of Standardized *Annona muricata* (Graviola) Leaf Extract via Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in

RAW 264.7 Macrophages. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2016, p. 2905127, 5 jan. 2016. DOI: 10.1155/2016/2905127

KIMBALL, AC; KEAN, BH. Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 4,048 obstetric patients. **American journal of obstetrics and Fuchs**, 1971.

KÜÇÜKERDÖNMEZ, C.; AKOVA, Y. A.; YILMAZ, G. Ocular toxoplasmosis presenting as neuroretinitis: report of two cases. **Ocular immunology and inflammation**, v. 10, n. 3, p. 229-34, set. 2002.

LALIBERTE, J.; CARRUTHERS, V. B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cellular and molecular life sciences**, 2008. DOI: 10.1007/s00018-008-7556-x

LEBECH, M et al. Feasibility of neonatal screening for toxoplasma infection in the absence of prenatal treatment. **The Lancet**, 1999.

LIESENFELD et al. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 2, p. 597-607, 1996. DOI: 10.1084/jem.184.2.597

LIESENFELD, O. et al. TNF- α , nitric oxide and IFN- γ are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, v. 21, n. 7, p. 365-376, 1999a. DOI: 10.1046/j.1365-3024.1999.00237.x

LIESENFELD, O. Immune response to *Toxoplasma gondii* in the gut. **Immunobiology**, v.201, n. 2, p. 229-239., 1999b. DOI: [10.1016/S0171-2985\(99\)80063-1](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(99)80063-1)

LIESENFELD, O.; DUNAY, I. R.; ERB, K. J. Infection with *Toxoplasma gondii* reduces established and developing Th2 responses induced by *Nippostrongylus brasiliensis* infection. **Infection and immunity**, v. 72, n. 7, p. 3812-22, 4 jul. 2004. DOI: 10.1128/IAI.72.7.3812-3822.2004

LINDSAY, D. S. et al. Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. **Veterinary parasitology**, v. 73, n. 1-2, p. 27-33, 1 dez. 1997.

MAENZ, M. et al. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. **Progress in retinal and eye research**, v. 39, p. 77-106, 6 mar. 2014. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.12.005

MANTLE, M. et al. Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. **Infection and immunity**, v. 57, n. 11, p. 3292-9, 3 nov. 1989.

MARANGONI, A. et al. *Chlamydia pneumoniae* acute liver infection affects hepatic cholesterol and triglyceride metabolism in mice. **Atherosclerosis**, v. 241, n. 2, p. 471-479, 2015. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.023

MARTINS-DUARTE, É. S. S.; DE SOUZA, W.; VOMMARO, R. C. *Toxoplasma gondii*: the effect of fluconazole combined with sulfadiazine and pyrimethamine against acute toxoplasmosis in murine model. **Experimental parasitology**, v. 133, n. 3, p. 294-9, 5 mar. 2013. DOI: 10.1016/j.exppara.2012.12.011

MATSUSHIGE, A. et al. Annonamine, a New Aporphine Alkaloid from the Leaves of *Annona muricata*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 60, n. 2, p. 257-259, 2012. DOI: 10.1248/cpb.60.257

MCSORLEY, S. J.; BEVINS, C. L. Paneth cells: targets of friendly fire. **Nature immunology**, 2013. DOI: 10.1038/ni.2519

MILLER et al. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 1, p. 23-39, 2008. DOI: 10.1016/j.ijpara.2008.08.002

MILOVANOVIĆ, I. et al. Evidence for host genetic regulation of altered lipid metabolism in experimental toxoplasmosis supported with gene data mining results. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0176700, jan. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0176700

MOGHADAMTOUSI, S. et al. *Annona muricata* leaves induce G₁ cell cycle arrest and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in human HCT-116 and HT-29 colon cancer cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 156, p. 277-89, 2 out. 2014. DOI: 10.1016/j.jep.2014.08.011

MOGHADAMTOUSI, S. et al. *Annona muricata* leaves accelerate wound healing in rats via involvement of Hsp70 and antioxidant defence. **International Journal of Surgery**, v. 18, p. 110-117, 2015. DOI: 10.1016/j.ijsu.2015.03.026

MOHD ABD RAZAK, M. R. et al. Effect of selected local medicinal plants on the asexual blood stage of chloroquine resistant *Plasmodium falciparum*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, p. 492, 3 jan. 2014. DOI: 10.1186/1472-6882-14-492

MONCADA, D.; KAMMANADIMINTI, S.; CHADEE, K. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 7, p. 305-311, 2003. DOI: 10.1016/S1471-4922(03)00122-3

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet (London, England)**, v. 363, n. 9425, p. 1965-76, 6 jun. 2004. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16412-X

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, 1983.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 269-85, 2 mar. 2011. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00992.x

MURATA, Y. et al. Identification of compounds that suppress *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0178203, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0178203

NASR, I; AHMED, F.; PULLISHER, F.; EL-ASHRAM, S.; RAMAIAH, V. Toxoplasmosis and anti-Toxoplasma effects of medicinal plant extracts -A mini-review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicina**, v.9, n. 8, p. 730-734, 2016. DOI: 10.1016/j.apjtm.2016.06.012, PMID: 27569880

NEWMAN, D.; CRAGG, G. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years . **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007. DOI: 10.1021/np068054v

NGUYEN-POUPLIN, J. et al. Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 417-427, 2007. DOI: 10.1016/j.jep.2006.08.011

OSORIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of *Colombian Annonaceae*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 630-5, 2 maio 2007. DOI: 10.1016/j.jep.2007.01.015

PADMA, P. Effect of alcohol extract of *Annona muricata* on cold immobilization stress induced tissue lipid peroxidation. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 326-327, 1997.

PADMA, P., et al. Effect of *Annona muricata* and *Polyalthia cerasoides* on brain neurotransmitters and enzyme monoamine oxidase following cold immobilization stress. **Journal of Natural Remedies**, v. 1/2, p.144-146, 2001.

PETERSEN, E; EATON, R.B. Control of congenital infection with *Toxoplasma gondii* by neonatal screening based on detection of specific immunoglobulin M antibodies eluted from phenylketonuria filter-paper blood-spot samples. **Acta Paediatrica Suppl**, v.432, p. 36-39, 1999. DOI: 10.1111/j.1651-2227.1999.tb01154.x

PETERSEN, E.; SCHMIDT, D. Sulfadiazine and pyrimethamine in the postnatal treatment of congenital toxoplasmosis: what are the options? **Expert review of anti-infective therapy**, v. 1, n. 1, p. 175-182, 2003. DOI: 10.1586/14787210.1.1.175

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 3, p. 141-53, 6 mar. 2014. DOI: 10.1038/nri3608

RAETZ et al. Parasite-induced TH1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- γ -dependent elimination of Paneth cells. **Nature Immunology**, v.14, n.2, 2013. DOI: 10.1038/ni.2508

RIBEIRO DE SOUZA, E. B. et al. Enhanced extraction yields and mobile phase separations by solvent mixtures for the analysis of metabolites in *Annona muricata* L. leaves. **Journal of separation science**, v. 32, n. 23-24, p. 4176-85, 2 dez. 2009. DOI: 10.1002/jssc.200900375

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 583-583, 2012. DOI: 10.1128/CMR.00026-12

ROSTKOWSKA, C. et al. Si-Accumulation In *Artemisia annua* Glandular Trichomes Increases Artemisinin Concentration, but Does Not Interfere In the Impairment of *Toxoplasma gondii* Growth. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1430, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.01430

SABIN, A. B.; FELDMAN, H. A. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoan Parasite (*Toxoplasma*). **Science (New York, N.Y.)**, v. 108, n. 2815, p. 660-3, 5 dez. 1948. DOI: 10.1126/science.108.2815.660

SALZMAN, N. H. et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. **Nature immunology**, v. 11, n. 1, p. 76-83, 5 jan. 2010. DOI: 10.1038/ni.1825

SALZMAN, N. H.; UNDERWOOD, M. A.; BEVINS, C. L. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. **Seminars in immunology**, v. 19, n. 2, p. 70-83, abr. 2007. DOI: 10.1016/j.smim.2007.04.002

SHIRAISHI, C. et al. Análise morfológica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados por *Toxoplasma gondii*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2146-2153, 2009. DOI: 10.1590/S0103-84782009000700030

SILVA, N. et al. *Toxoplasma gondii*: The role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 1, p. 65-72, 2009. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.05.011

SILVA, N. M. et al. *Toxoplasma gondii*: *in vivo* expression of BAG-5 and cyst formation is independent of TNF p55 receptor and inducible nitric oxide synthase functions. **Microbes and infection**, v. 4, n. 3, p. 261-70, 5 mar. 2002. DOI:

SOMSAK, V.; POLWIANG, N.; CHACHIYO, S. *In Vivo* Antimalarial Activity of *Annona muricata* Leaf Extract in Mice Infected with *Plasmodium berghei*. **Journal of pathogens**, v. 2016, p. 3264070, 5 jan. 2016. DOI: 10.1155/2016/3264070

SUN, S. et al. Epithelial Sel1L is required for the maintenance of intestinal homeostasis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 27, n. 3, p. 483-490, 2016. DOI: 10.1091/mbc.E15-10-0724

SUZUKI, Y. et al. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 240, n. 4851, p. 516-8, 5 abr. 1988.

SUZUKI, Y., CONLEY, FK. & REMINGTON, JS. Importance of endogenous IFN- γ for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. **Journal of Immunology**, v.143, n.6, p. 2045-2050, 1989. PMID: 2506275

TAYLOR, L. Technical Date Report for Graviola (*Annona muricata*). **Sage Press** , 2002.
TENTER, A.; HECKEROTH, A.; WEISS, L. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, 2000. DOI: 10.1016/S0020-7519(00)00124-7

TEO, C. F. et al. Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 679-88, 4 fev. 2007. DOI: 10.1128/AAC.01059-06

TORGERSON, P. R.; MASTROIACOVO, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 91, n. 7, p. 501-508, 2013. DOI: 10.2471/BLT.12.111732

TORRES, M. P. P. et al. Graviola: a novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* through altering cell metabolism. **Cancer letters**, v. 323, n. 1, p. 29-40, 1 out. 2012. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.03.031

TREVIZAN, A. R. et al. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. **Experimental parasitology**, v. 165, p. 22-29, 3 mar. 2016. DOI: 10.1016/j.exppara.2016.03.015

VIJAYAMEENA, C et al. Original Research Article Phytochemical screening and assessment of antibacterial activity for the bioactive compounds in *Annona muricata*. **International Journal of Current Microbiology and Applies Sciences**, v. 2, p. 1-8, 2013.

VILA-NOVA, N. S. et al. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 567-71, 6 out. 2011. DOI: 10.1590/S0037-86822011000500007

VILA-NOVA, N. S. et al. Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corosolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. **Experimental parasitology**, v. 133, n. 3, p. 334-8, 5 mar. 2013. DOI: 10.1016/j.exppara.2012.11.025

VILLERET, B. et al. Blockade of IL-1R signaling diminishes Paneth cell depletion and *Toxoplasma gondii* induced ileitis in mice. **American journal of clinical and experimental immunology**, v. 2, n. 1, p. 107, 2013.

YANG, C. et al. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in Graviola (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 6, p. 656-65, 1 jun. 2015. DOI: 10.1093/carcin/bgv046

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 2, p. nri3598, 2014. DOI: 10.1038/nri3598

ZAMUDIO-CUEVAS et al. The antioxidant activity of soursop decreases the expression of a member of the NADPH oxidase family. **Food & Function**, v. 5, n. 2, p. 303-309, 2013. DOI: 10.1039/C3FO60135H

ANEXOS



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 006/15, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Efeito de extratos de plantas *Zingiber officinale* Roscoe (Gengibre), *Camellia sinensis* (Chá Verde), *Annona muricata* L. (Graviola), *Chamomilla recutita* (Camomila), *Momordica charantia* L. (Melão Amargo) no controle da infecção *in vitro* e *in vivo* por *Toxoplasma gondii*", sob a responsabilidade da **Profª Drª Neide Maria da Silva** 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 **08 de maio de 2015**.

(We certify that the protocol nº 006/15, about "Efeito de extratos de plantas *Zingiber officinale* Roscoe (Gengibre), *Camellia sinensis* (Chá Verde), *Annona muricata* L. (Graviola), *Chamomilla recutita* (Camomila), *Momordica charantia* L. (Melão Amargo) no controle da infecção *in vitro* e *in vivo* por *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 08/05/2015).

Uberlândia, 14 de maio de 2015.

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