

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Avaliação do uso terapêutico de extrato do fungo *Trichoderma stromaticum* na infecção experimental de camundongos C57BL/6 com *Toxoplasma gondii*

Layane Alencar Costa Nascimento Sousa
Uberlândia 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Avaliação do uso terapêutico de extrato do fungo *Trichoderma stromaticum* na infecção experimental de camundongos C57BL/6 com *Toxoplasma gondii*

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.

Layane Alencar Costa Nascimento Sousa

Uberlândia 2019

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

S725a Sousa, Layane Alencar Costa Nascimento, 1983-
2020 Avaliação do uso terapêutico de extrato do fungo *Trichoderma stromaticum* na infecção experimental de camundongos C57BL/6 com *Toxoplasma gondii* [recurso eletrônico] / Layane Alencar Costa Nascimento Sousa. - 2020.

Orientador: Neide Maria da Silva.

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

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.3604>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. I. Silva, Neide Maria da, 1961-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Nelson Marcos Ferreira - CRB-6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado, número 123 do PPIPA				
Data:	Vinte e nove de agosto de dois mil e dezenove	Hora de início:	13 h e 30 min	Hora de encerramento:	18h e 15min
Matrícula do Discente:	11513IPA005				
Nome do Discente:	Layane Alencar Costa Nascimento				
Título do Trabalho:	Avaliação do uso terapêutico de extrato do fungo <i>Trichoderma stromaticum</i> na infecção experimental de camundongos C57Bl/6 com <i>Toxoplasma gondii</i>				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunopatologia e Alergia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Alterações imunopatológicas em infecções por protozoários, com ênfase em toxoplasma gondii, bactérias e helmintos				

Reuniu-se no Bloco 2B, sala 2B216, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, presencialmente e por conferência web, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta: Profa. Dra. Wania Rezende Lima - UFMT (conferência web); Dr. Carlos Antônio Trindade da Silva - SLMANDIC; Dra. Ester Cristina Borges Araújo - ICBIM/UFU; Dr. Mário César de Oliveira - UFU e Profa. Dra. Neide Maria da Silva - ICBIM/UFU orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a).Neide Maria da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor(a).

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Neide Maria da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/08/2019, às 18:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ester Cristina Borges Araujo, Técnico(a) de Laboratório**, em 29/08/2019, às 18:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mario Cezar de Oliveira, Técnico(a) de Laboratório**, em 29/08/2019, às 18:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **CARLOS ANTONIO TRINDADE DA SILVA, Usuário Externo**, em 29/08/2019, às 18:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wania Rezende Lima, Usuário Externo**, em 29/08/2019, às 18:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1480912** e o código CRC **0B028B3F**.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus filhos Mateus e Felipe por me ensinarem o maior amor do mundo e ao meu grande companheiro da vida Romulo. Amo vocês!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ser essencial na minha vida e ter me transformado numa mulher forte e guerreira. Por ser meu socorro presente nos momentos de dor e angústia e por ter colocado pessoas maravilhosas ao longo da vida acadêmica.

À minha orientadora professora Dra. Neide Maria da Silva por me aceitar e acolher em seu laboratório, por todos esses anos de orientação, trabalho científico e amizade. Obrigada por compreender as dificuldades que passei, serei eternamente grata.

A professora Dra. Jane Lima dos Santos que indicou eu e o Romulo para trabalharmos com a professora Neide, obrigada pela confiança.

Ao meu querido esposo Romulo por sempre acreditar em mim e me incentivar a seguir em frente, sem o seu companheirismo e amor eu não teria conseguido.

Aos meus amados filhos Mateus e Felipe, que me transformam todos os dias em uma pessoa melhor, com vocês experimento o melhor sentimento do mundo. Espero ser um exemplo de perseverança para vocês.

Aos meus pais Francisco e Luisa, por terem dado o melhor de cada um para que eu me tornasse a pessoa que sou, todo o amor e dedicação doados foram essenciais em minha vida. Amo vocês!

Aos meus sogros Cícero e Edna, a quem tenho um grande amor, respeito e gratidão. Obrigada por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus irmãos, por torcerem por mim.

Aos meus cunhados, compadres e amigos Fábio, Mara, Tiago e Mariana, obrigado por todo carinho, torcida e apoio, vocês são especiais na minha vida.

Às minhas irmãs de coração e amigas da vida Ana Luisa, Lilianne e Thaisa, eu não imagino minha vida sem vocês! Com certeza vocês são presentes de Deus.

Aos meus sobrinhos amados Eduardo, Pedro, Rafaela, Manuela, José Otávio e em especial Miguel, meu guerreiro lindo que nos ensina a sermos pessoas melhores e valorizar cada pequena conquista da vida. Amo vocês!

A todos os colegas que passaram e estão no laboratório de Imunopatologia da Professora Neide, todos foram essenciais para realização desse trabalho, muito obrigada de coração.

Às “meninas do laboratório” Ester, Marisol, Yusmaris, Loyane, Wania, Mariele, Flávia e Natália, obrigada por todos esses anos de amizade, diversão e ajuda, levarei vocês no meu coração.

À professora Dra. Bellisa que sempre foi muito prestativa e me ajudou desde o mestrado, obrigada por todos os ensinamentos.

À minha amiga Pâmela que é uma pessoa de luz e sempre me confortou com seu jeito doce e delicado, foi muito bom ter você ao meu lado durante a pós graduação.

Aos queridos amigos Wania, Kleber, Maria Clara, Tia Luzia, Carolina, Vinícius, Sofia, Lais, Gustavo, Tiara, Mariani e Maria Inês por estarem presentes em nossas vidas.

Aos técnicos da histologia Ester, Fabrício, Anna Isabel, Mariani e Rosiane que me ajudaram desde o início;

Às secretárias do PPIPA Lucileide e Lucélia que sempre me auxiliaram de uma maneira muito prestativa, muito obrigada;

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	13
1.2 Ciclo biológico e toxoplasmose	14
1.3 Resposta imune a <i>T. gondii</i>	16
1.4 Tratamento da toxoplasmose	20
1.5 <i>Trichoderma stromaticum</i>	21
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Manutenção de culturas de <i>T. stromaticum</i> e preparação do extrato etanólico bruto	25
4.2 Manutenção e cuidados dos animais de experimentação	25
4.3 Cepa do parasita	25
4.4 Manutenção e cuidados dos animais de experimentação	26
4.5 Desenho experimental, coleta e processamento das amostras	26
4.6 Contagem de cistos cerebrais	28
4.7 Reação de imuno-histoquímica para detecção de parasitos teciduais	28
4.8 Dosagem de lipídeos séricos	29
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
6. RESULTADOS	31
6.1 O tratamento com ExtTs não interfere na sobrevivência e variação do peso corporal de camundongos infectados com <i>T. gondii</i>	31
6.2 O tratamento com ExtTs reduz o parasitismo intestinal e melhora a patologia intestinal de camundongos infectados com <i>T. gondii</i>	33
6.3 O tratamento com ExtTs diminui as alterações inflamatórias no fígado e pulmões de camundongos infectados com <i>T. gondii</i>	37
6.4 O tratamento com ExtTs influencia o perfil lipídico sérico de camundongos infectados com <i>T. gondii</i>	40

6.5 O tratamento com ExtTs não interfere no parasitismo cerebral de camundongos cronicamente infectados com <i>T. gondii</i>	41
7. DISCUSSÃO	42
CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS	57

LISTA DE ABREVIACÕES

% - porcentagem

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

APCs – células apresentadoras de antígeno

Células NK – células “natural killer”

Células Treg – células T reguladoras

CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais

CNS - Sistema Nervoso Central

ExtTs – extrato de *Trichoderma stromaticum*

H&E - Hematoxilina e eosina

HIV - vírus da imunodeficiência humana

IFN- γ – Interferon gama

IgA - imunoglobulina A

IgG – imunoglobulina G

IgG – Imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

IL – 17A – Interleucina 17A

IL – 6 – Interleucina 6

IL-10 – interleucina 10

IL-12 – interleucina 12

IL-1 β – Interleucina-1-beta

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-8 – Interleucina 8

kg – Quilograma

LPS – Lipopolissacarídeo

mg – Miligramas

NO – óxido nítrico

PAMPs - padrões moleculares associados ao patógeno

PBS – salina tamponada com fosfato

PEF - fator de incremento de penetração

ROP - Roptrias

ROS – Espécies reativas de oxigênio

TGF- β – Fator transformador de crescimento tipo beta

TGF- β – fator transformador de crescimento beta

Th1 – T *helper* 1

Th17 –T *helper* 17

Th2 – T *helper* 2

TLR - Receptor tipo Toll

TNF – α – Fator de necrose tumoral alfa

μ g – Microgramas

μ l – Microlitros

RESUMO

Trichoderma é um fungo bem conhecido por inibir o crescimento e desenvolvimento de uma variedade de patógenos vegetais. O extrato etanólico bruto de *Trichoderma stromaticum* (ExtTs) foi capaz de diminuir o crescimento de *P. falciparum* em hemácias humanas infectadas, aumentar a sobrevivência e prevenir sinais neurológicos em camundongos infectados por *P. berghei*-ANKA. Camundongos C57BL/6 infectados por via oral com *Toxoplasma gondii* desenvolvem uma resposta imune inflamatória no intestino delgado que, dependendo da carga parasitária, pode levar à morte na fase aguda ou à encefalite toxoplásmica na fase crônica. O tratamento da toxoplasmose normalmente é baseado na combinação de sulfadiazina e pirimetamina, no entanto, numerosos efeitos colaterais têm sido relacionados ao uso desses medicamentos. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito do tratamento com ExtTs na infecção oral por *T. gondii* em camundongos C57BL/6. Para isso, os animais foram infectados com *T. gondii*, tratados diariamente com ExtTs, e as características clínicas, bioquímicas e histológicas foram monitoradas. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com ExtTs foi capaz de diminuir o parasitismo e a inflamação no intestino delgado e fígado dos animais infectados. Observou-se uma tendência em reduzir o número de cistos cerebrais durante a infecção crônica. Além disso, o tratamento com ExtTs previne o aumento das frações lipídicas sistemicamente, as quais são elementos importantes para o crescimento de *T. gondii*.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, *Trichoderma stromaticum*, fase aguda, intestino delgado, tratamento da toxoplasmose.

ABSTRACT

Trichoderma is well known fungi by inhibit the growth and development of a variety of plant pathogens. The crude ethanolic extract of *T. stromaticum* (Ext-Ts) are able to decrease the growth of *P. falciparum* in infected human red blood cells and, increase the survival and prevent neurological signs of *P. berghei*-ANKA-infected mice. *Toxoplasma gondii* orally infected C57BL/6 mice develop an inflammatory immune response in the small intestine that depending on the parasite load can lead to death in acute phase or toxoplasmic encephalitis in chronic phase. The most common treatment of toxoplasmosis is based in a combination of sulfadiazine and pyrimethamine, however, numerous collateral side effects have been described. Thus, the aim of this study was to verify the effect of treatment with ExtTs in oral *T. gondii*-infection of C57BL/6 mice. For this purpose, animals were infected with *T. gondii*, treated daily with ExtTs, and clinical, biochemical and histological features were monitored. It was observed that the ExtTs-treatment was able to decrease the parasitism and inflammation in the small intestine and liver in acute phase and parasitism in the brain in chronic phase of infection. Additionally, the ExtTs-treatment prevented the increase of lipid fractions systemically which are important for the parasite growth.

Key Words: *Toxoplasma gondii*, *Trichoderma stromaticum*, acute phase, small intestine, treatment of toxoplasmosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório do filo Apicomplexa, subclasse coccídea (MONTROYA; LIESENFELD, 2004), sendo responsável por 10 – 50% de infecções humanas em todo mundo (EGAN; COHEN; DENKERS, 2012; MILLER, C. M. *et al.*, 2009). Estima-se que até 50% das crianças do ensino fundamental e 50-80% das mulheres em idade fértil sejam soropositivas para *T. gondii* no Brasil (DUBEY, J. P. GENNARI *et al.*, 2012). Neste aspecto, uma das características mais importantes deste protozoário é sua habilidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros, incluindo aves, répteis e mamíferos (WEBSTER, 2010; PAREDES-SANTOS *et al.*, 2013).

Os parasitas do filo Apicomplexa são caracterizados pela presença do complexo apical, composto de organelas secretoras especializadas na adesão, invasão e multiplicação do parasito nas células hospedeiras como as micronemas, roptrias e grânulos densos (KIM; WEISS, 2008). As micronemas são organelas secretoras de moléculas adesivas, domínios tipo integrinas, fator de crescimento epitelial e lectina, sendo localizadas na região apical do parasito e abaixo do complexo da membrana interna (FOURMAUX *et al.*, 1996). Essas organelas atuam no reconhecimento e na adesão inicial do parasito aos receptores de superfícies da célula hospedeira (CARRUTHERS, 2002). As roptrias são organelas especializadas associadas com as micronemas, sendo seu conteúdo liberado durante a invasão do parasito, movimento de “gliding” e formação do vacúolo parasitóforo (BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008). Estão localizadas na região anterior do núcleo do parasito e são constituídas por formações membranosas de extremidades dilatadas. Já foram descritas vinte e nove proteínas de roptrias (ROP1 a ROP29) e elas estão associadas à internalização do parasito à célula hospedeira (BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008). Essa internalização é feita através da liberação de enzimas proteolíticas, como ROP-1 ou PEF (fator de incremento de penetração), que atuam na digestão de proteínas da membrana celular do hospedeiro (KIM; WEISS, 2004). Além disso, as roptrias liberam seu conteúdo proteico no citoplasma da célula hospedeira e atuam na formação do vacúolo parasitóforo ficando associadas a ele, garantindo a natureza não fusogênica do vacúolo e atuando no recrutamento de mitocôndrias e retículo endoplasmático (SINAI; WEBSTER; JOINER, 1997; CARRUTHERS, 2002; SINAI, 2008). Os grânulos densos presentes no citoplasma do parasito, contêm glicoproteínas que quando liberadas no vacúolo parasitóforo possibilitam ao parasito evadir das respostas imunes da célula hospedeira, bem

como a formação de túbulos especializados para aumentar a aquisição de nutrientes pelo parasito (COPPENS et al., 2006; CARRUTHERS; SUZUKI, 2007).

T. gondii apresenta três estágios distintos: esporozoítas em oocistos, taquizoítas e bradizoítas (HAMPTON, 2015). Em humanos e em outros hospedeiros intermediários, o parasito existe sob duas formas - taquizoítas e bradizoítas. A primeira forma do parasito é caracterizada pela rápida replicação dentro das células do hospedeiro podendo causar a doença. Enquanto que pelo uso de drogas ou por pressão do sistema imune, o parasito pode ser controlado, sendo que alguns taquizoítas podem escapar e se desenvolver em bradizoítas, que irão se transformar em cistos em uma variedade de tecidos incluindo músculos esqueléticos e cérebro caracterizando assim a fase crônica da infecção podendo novamente se diferenciar em taquizoítas em indivíduos imunocomprometidos como, por exemplo, os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (WOHLFERT; BLADER; WILSON, 2017).

A estrutura populacional de *T. gondii* é tanto geneticamente quanto clonalmente diversificada, podendo ser subdividida em três linhagens encontradas na América do Norte e Europa denominadas de cepas tipo I, II e III: as cepas do tipo II (ME-49) são encontradas predominantemente em pacientes com AIDS e causando toxoplasmose em humanos, já as cepas I e III são encontradas em doenças congênitas. As cepas do tipo I são geralmente letais para camundongos, porém as cepas dos tipos II e III são menos virulentas (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011). A transcrição de genes das células infectadas é drasticamente afetada incluindo aqueles genes envolvidos no metabolismo energético, resposta imune e sinalização (BLADER; MANGER; BOOTHROYD, 2001; STUTZ et al., 2012).

1.2 Ciclo biológico e toxoplasmose

O ciclo de vida de *T. gondii* é heteroxênico, tendo como hospedeiros definitivos os gêneros *Felix* e *Lynx*, e hospedeiros intermediários, aves e mamíferos incluindo o homem (DUBEY, 2009). Os felídeos podem ser infectados com qualquer uma das fases evolutivas de *T. gondii*. Após ingestão de oocistos infectantes ou cistos teciduais, esporozoítos, bradizoítos ou taquizoítas são liberados na mucosa gástrica que migram para o epitélio intestinal, e penetram nos enterócitos dos felídeos e por esquizogonia se transformam intracelularmente em esquizontes multinucleados após 3 a 7 dias de infecção. Os núcleos dos esquizontes iniciam lentamente a sua individualização por divisão da membrana plasmática, originando os merozoítos. Estes, por sua vez, originam os gametas masculino e feminino e a fertilização ocorre no epitélio intestinal do hospedeiro, levando à formação dos oocistos. Juntamente com as fezes,

os oocistos são liberados para o ambiente onde sofrem esporulação, resultando em quatro esporozoítas no interior de cada oocisto (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). A excreção dos oocistos pelos felídeos começa de três a sete dias após a ingestão dos cistos teciduais e pode se prolongar por mais de 20 dias. Os oocistos podem infectar uma grande variedade de hospedeiros intermediários quando estes ingerem água ou alimentos contaminados (JONES; DUBEY, 2010).

Um dos fatores que torna *T. gondii* um dos parasitos mais bem-sucedidos é poder desenvolver-se assexuadamente, permitindo a transmissão entre os hospedeiros intermediários homeotérmicos através da predação e transmissão vertical sem o envolvimento de um hospedeiro definitivo (SU *et al.*, 2003; YAN *et al.*, 2016). Os humanos podem ser infectados de diversas formas, por exemplo, pela ingestão de água e alimentos contaminados por oocistos, ingestão de carne malcozida de bovinos e caprinos contendo cistos teciduais, transplante de órgãos, transfusão de sangue, contato direto com os parasitos em acidentes laboratoriais ou através de transmissão vertical (FOROUTAN-RAD *et al.*, 2016; GALVÁN-RAMÍREZ *et al.*, 2013; LYNCH *et al.*, 2000; ROBERT-GANGNEUX, 2014). A fase assexuada de *T. gondii* se inicia no intestino delgado dos hospedeiros intermediários quando oocistos no meio ambiente, ou cistos teciduais são ingeridos, em seguida, esporozoítas ou bradizoítas são liberados a partir de oocistos ou cistos, respectivamente; penetram nos enterócitos e rapidamente se desenvolvem em taquizoítas, os quais multiplicam-se rapidamente nas células nucleadas. Este parasito pode ser disseminado pelo corpo através dos leucócitos no sangue, e uma vez estabelecida a infecção, ocorre a formação de cistos teciduais, levando ao estágio crônico do ciclo assexuado (YAN *et al.*, 2016).

A toxoplasmose é uma infecção que geralmente cursa de modo assintomático ou subclínico na maioria dos indivíduos infectados. Em adultos saudáveis, a toxoplasmose produz uma infecção relativamente leve, com febre elevada, aumento dos gânglios linfáticos e fraqueza muscular (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). No entanto, manifestações graves da infecção podem ser observadas em indivíduos imunocomprometidos e em crianças ou recém-nascidos infectados congenitamente, caracterizando um importante problema de saúde pública (JENNIFER A *et al.*, 2003). Nos indivíduos imunocomprometidos, representados por pessoas que fazem uso de drogas imunossupressoras ou que apresentam deficiências no seu sistema imunológico, a forma grave da toxoplasmose normalmente surge como a reativação de uma infecção latente, quando bradizoítas no interior de cistos teciduais retornam ao seu estágio de

taquizoítas (MILLER, C. M. *et al.*, 2009). O sistema nervoso central é o local de manifestações mais graves nesses indivíduos, levando a um quadro de encefalite aguda (PORTER; SANDE, 1992). Por outro lado, os recém-nascidos infectados congenitamente podem apresentar um quadro agudo subclínico ou benigno ao nascimento e durante a infância. No entanto, na puberdade ou idade adulta, esses indivíduos podem apresentar quadros de retinocoroidite resultantes de uma infecção não diagnosticada precocemente. Além disso, esses recém-nascidos podem ser sintomáticos, apresentando sinais clínicos graves como calcificações intracranianas, hidrocefalia, microcefalia, retinocoroidite, epilepsia, retardamento mental e até cegueira (CAÑEDO-SOLARES *et al.*, 2008; PIPER; WEN, 1999).

1.3 Resposta imune a *T. gondii*

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

O início da resposta imune, após infecção oral por oocistos ou cistos de *T. gondii*, ocorre na mucosa intestinal. O sistema imune da mucosa é composto por uma camada de células epiteliais que separa a lâmina própria do lúmen intestinal (MOWAT, 2003). Neste epitélio, encontra-se uma população heterogênea de células T denominadas linfócitos intraepiteliais. Estes linfócitos contribuem com a homeostase e defesa do ambiente intestinal, mantendo a integridade da barreira epitelial. A lâmina própria é composta por miofibroblastos, células T, células B, macrófagos e células dendríticas. Além dessas células, as placas de Peyer desempenham um importante papel de proteção. Essas placas são agregadas de nódulos linfóides que formam parte do tecido linfóide associado às mucosas, e ajudam no transporte de antígenos e patógenos sendo considerados sensores imunes do intestino (CHEROUTRE; LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011; JUNG; HUGOT; BARREAU, 2010).

Receptores do sistema imune inato tais como os receptores TLRs têm um importante papel no reconhecimento do parasito pelo hospedeiro. Os TLRs específicos envolvidos no reconhecimento de *T. gondii* incluem TLRs 2, 4, 7, 9, e 11. Camundongos deficientes em elementos essenciais comuns da via de sinalização TLR como IRAK4 ou MyD88 mostram uma prejudicada resistência a *T. gondii* devido a uma resposta deficiente de citocinas responsáveis pelo controle do parasita. O TLR-11 recruta a molécula adaptadora MyD88, que está envolvida na sinalização intracelular dos TLRs, para o reconhecimento da molécula profilina (RAETZ *et al.*, 2013), essencial para motilidade e invasão celular de *T. gondii* (PLATTNER *et al.*, 2008). A ativação de MyD88 direciona a produção de fator de necrose tumoral (TNF- α) e a maior expressão de moléculas de histocompatibilidade (MHC) classe II nos macrófagos (DEBIERREGROCKIEGO *et al.*, 2009). Na ausência do TLR11, a combinação de outros dois receptores endossomais TLR7 e TLR9, também recruta MyD88 ativando a resposta imune (ANDRADE *et al.*, 2013). Portanto, TLRs são essenciais para uma eficiente resposta imune celular contra infecções por *T. gondii*.

A imunidade mediada por células é caracterizada por uma forte resposta Th1 orquestrada por células TCD4⁺ e dominada pela produção de mediadores inflamatórios, sendo a interleucina (IL)-12 e interferon (IFN)- γ as citocinas pró-inflamatórias mais atuantes no controle da infecção (GAZZINELLI, R T *et al.*, 1994). Células dendríticas e macrófagos ativados via *toll like receptors* (TLR) produzem IL-12 que ativa as células NK e linfócitos T a produzirem IFN- γ (GAZZINELLI, RICARDO T. *et al.*, 2014), IFN- γ ativa a expressão de mediadores pró-inflamatórios pelas células da imunidade inata, favorecendo o desenvolvimento dos linfócitos T, que são a base do controle da infecção por *T. gondii* no hospedeiro (GAZZINELLI, M. F. *et al.*, 2006).

Citocinas como IFN- γ e IL-2 são extremamente importantes na resposta contra *T. gondii*. IFN- γ possui inúmeras atividades biológicas, dentre elas a ativação dos mecanismos microbicidas de macrófagos, a promoção da citotoxicidade de linfócitos TCD8⁺, o aumento da expressão de moléculas MHC-II (MCCABE; LUFT; REMINGTON, 1984), a conversão de taquizoítas em bradizoítas e, ao mesmo tempo, a prevenção da ruptura dos cistos teciduais, impedindo a reativação do parasito no hospedeiro (SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010). Estudos anteriores, demonstraram que a produção de IFN- γ por células T é essencial para prevenção da reativação da infecção por *T. gondii* (DENKERS, E Y *et al.*, 1997). Além disso, algumas enzimas induzidas por IFN- γ da família de guanósídeo trifosfato (GTPases) também mostraram atividades contra a infecção por *T. gondii*, pois estas enzimas tendem a se acumular nas proximidades do vacúolo parasitóforo, contribuindo para a sua destruição

(BUTCHER *et al.*, 2005; COLLAZO *et al.*, 2001; ZHAO *et al.*, 2009). Por outro lado, IL-2 atua no recrutamento de novos linfócitos TCD4+ e promove a ativação de células TCD8+ ou células citotóxicas, que produzem enzimas proteolíticas – granzimas e perforinas, capazes de romper a membrana de parasitos livres ou células infectadas pelo mesmo (SUBAUSTE; KONIARIS; REMINGTON, 1991).

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

Além de IFN- γ , IL-12, IL-1, IL-2 e TNF- α , *T. gondii* também induz a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-17A (Passos *et al.*, 2010). Durante infecção por *T. gondii*, as células NK demonstraram serem responsáveis pela maior produção de IL-17A em camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes *Recombination-activating genes* ($RAG^{-/-}$) e esta produção foi influenciada por TGF- β , IL-23 e principalmente por IL-6 (PASSOS *et al.*, 2010). A sinalização intracelular mediada por IL-17 exerce um papel protetor no hospedeiro contra infecção por *T. gondii*, uma vez que camundongos geneticamente deficientes para o receptor específico de IL-17 apresentaram alta taxa de mortalidade devido ao não controle da replicação do parasito no intestino delgado (KELLY *et al.*, 2005). Além disso, IL-17 parece ser importante no recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (KELLY *et al.*, 2005). Apesar de *T. gondii* induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias no hospedeiro, *T. gondii* também é capaz de induzir a produção de citocinas imunomoduladoras como IL-10 e fator transformador de crescimento (TGF)- β (GAZZINELLI, R T *et al.*, 1996). IL-10 tem o papel de regular a produção de IFN- γ e a proliferação de linfócitos T, antagonizando os efeitos próinflamatórios desencadeados pela resposta imune Th1 e prevenindo uma resposta imune exacerbada prejudicial ao próprio hospedeiro (LANG; GROSS; LÜDER, 2007). Além de IL-10, TGF- β também exerce função imunomoduladora, uma vez que induz à redução da produção de IFN- γ por células NK e à desativação de macrófagos (LANG; GROSS; LÜDER, 2007).

A produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) também são estratégias utilizadas pelos fagócitos, durante a resposta imune inata, na tentativa de eliminação de *T. gondii*. As moléculas de NO, resultantes do metabolismo de L-arginina em L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), expressas em resposta a diversos estímulos incluindo IFN- γ , são produzidas por várias células da resposta imune inata, tais como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células NK, sendo importantes para a resistência inata do hospedeiro frente à infecção por *T. gondii* (MILLER, C. M. *et al.*, 2009). NO pode eliminar diretamente taquizoítos de *T. gondii*, inibindo enzimas mitocondriais e nucleares essenciais (BRUNET, 2001).

De um modo geral, a resposta imune do hospedeiro contra *T. gondii* é tipicamente celular e pró-inflamatória, caracterizada pela alta produção de citocinas inflamatórias que ativam células fundamentais no controle da infecção (DENKERS, ERIC Y., 2003).

A imunidade humoral desempenha um papel muito importante na resistência da infecção por *T. gondii*. Anticorpos podem regular a fagocitose do parasita, prevenir a invasão e estimular a via clássica do complemento para fornecer proteção eficaz (PIFER; YAROVINSKY, 2011). Em experimentos com camundongos B cell-deficient (μ MT), que são deficientes para células B, esses apresentam produção normal de IFN- γ , mas sucumbem a infecção dentro de 3-4 semanas após o desafio, associado com altas cargas parasitárias no SNC (KANG; REMINGTON; SUZUKI, 2000). O aumento de susceptibilidade é atribuído a falta de anticorpos, já que a transferência passiva de anticorpos confere proteção a estes mesmos camundongos (SAYLES; GIBSON; JOHNSON, 2000).

A imunoglobulina M (IgM) é produzida logo após a infecção por *T. gondii*. As IgMs são as melhores ativadoras do sistema do complemento e, devido a sua estrutura, são capazes de excelente aglutinação e têm um alto nível de citotoxicidade. Os principais antígenos alvo dessas imunoglobulinas são as proteínas de superfície do parasita (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004).

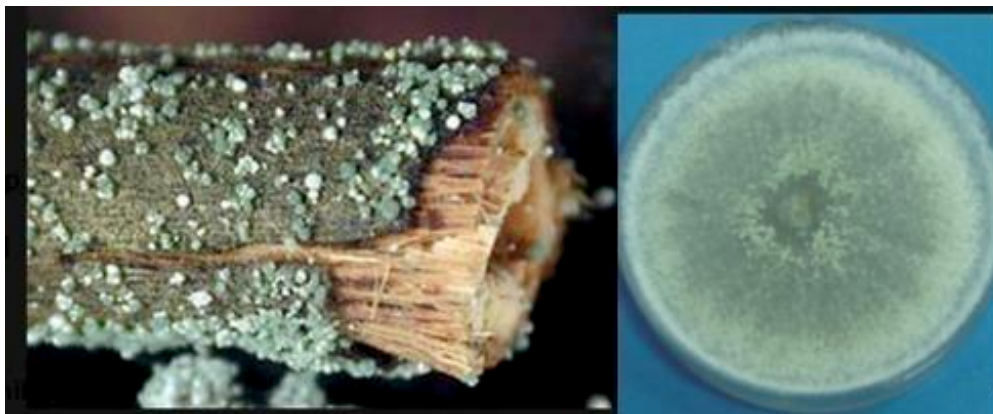
A imunoglobulina G (IgG) é uma classe de imunoglobulina composta de várias subclasses, que aparecem em proporções desiguais durante a infecção. Em humanos estão presentes as subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Vários estudos da toxoplasmose humana têm demonstrado que IgG1 é a primeira a ser ativada e é dominante no plasma, enquanto que anticorpos IgG2 e IgG3 são observados em baixos níveis e os anticorpos IgG4 podem não ser detectados (HUSKINSON; THULLIEZ; REMINGTON, 1990). Anticorpos IgG1 e IgG3 são induzidos por IFN- γ sua produção é aumentada por ação de IL-10 e TGF- β . A produção de IgG2 é induzida por IL-2 e aumentada por IL-6, enquanto IgG4 é induzida por IL-4 e IL-13. Os anticorpos IgG e suas subclasses promovem a citotoxicidade dependente de anticorpo ou

opsonização, graças aos receptores Fcs presentes nos macrófagos e nas células polimorfonucleadas, ou devido à citólise mediada por complemento ou por células NK (CAÑEDO-SOLARES *et al.*, 2008). A imunoglobulina A (IgA) é observada em duas formas: IgA de mucosa que é encontrada nas secreções mucosas e IgA do plasma. Na toxoplasmose, a IgA pode ser encontrada no trato digestivo e no plasma de animais e de humanos. Segundo Chardès & Bout (1993), os anticorpos IgAs constituem mais de 80% de todos os anticorpos associados a mucosa e tecido (CHARDÈS; BOUT, 1993). Essa imunoglobulina persiste por seis a sete meses durante toxoplasmose, entretanto varia bastante na quantidade e duração em adultos e recém-nascidos infectados pela via congênita. O sistema imune na mucosa possui extensa população de células linfóides que rapidamente entram em contato com o parasito durante sua penetração intestinal desencadeando a produção de citocinas e a produção de anticorpos que agem no local. Estudos indicam que IgA é um elemento importante da imunidade de mucosa contra a infecção oral por cistos de *T. gondii* e, portanto, esse isotipo de anticorpo pode ser importante para evitar a reinfecção (DENKERS, E Y *et al.*, 1997).

1.4 Tratamento da toxoplasmose

Em humanos, o principal esquema terapêutico para toxoplasmose consiste na combinação dos fármacos antifolato, pirimetamina e sulfadiazina. Contudo, as taxas de falha permanecem significativas. Outras combinações farmacológicas incluindo o uso de pirimetamina em conjunto com clindamicina, claritromicina, azitromicina ou atovaquona, ou a monoterapia com sulfametoxazol-trimetoprim (TMP-SMX), tem sido usadas; no entanto, nenhuma foi considerada superior à combinação padrão de pirimetamina e sulfadiazina. (DUNAY *et al.*, 2018). A sulfadiazina e a pirimetamina agem sinergicamente no bloqueio da via de síntese do folato por meio da inibição das enzimas dihidropteroato sintase (DHPS) e dihidrofolato redutase (DHFR), que são essenciais para a sobrevivência e replicação do parasito (ANDERSON, 2005). No entanto, a alta frequência de efeitos colaterais, incluindo reações alérgicas e hematotoxicidade, muitas vezes impossibilita a conclusão de um curso completo da terapia (DANNEMANN *et al.*, 1992). Estudo anterior demonstrou o uso da infusão de *Artemisia annua*, como um tratamento eficaz no controle da infecção sistêmica por *T. gondii* em camundongos C57BL/6, apresentando uma baixa toxicidade e inibição direta do crescimento do parasito (DE OLIVEIRA *et al.*, 2009). Assim, a descoberta de tratamentos alternativos contra o parasita, que apresentem menos efeitos colaterais são cruciais para o tratamento da toxoplasmose.

1.5 *Trichoderma stromaticum*



Os fungos do gênero *Trichoderma* (ascomicetos) estão amplamente distribuídos por todo o mundo estando presentes em quase todos os tipos de solo e ambientes naturais, especialmente naqueles contendo matéria orgânica. *T. stromaticum* é um fungo filamentoso que possui conidióforos com fiálides agrupadas em ramos laterais curtos, conídios glabros, oblongos e elipsoidais, e abundantes clamidósporos. Se desenvolve em meio Ágar Batata Dextrose, onde expressa colônias radiadas, densas, geralmente de cor branca, com conídios brancos que com o tempo podem variar entre os tons de amarelo, verde ou verde amarelado (SAMUELS *et al.*, 2000). Espécies de *Trichoderma* são bem conhecidos por inibirem o crescimento e o desenvolvimento de uma variedade de patógenos de plantas (HERRERAESTRELLA & CHET, 1998; BENHAMOU; CHET, 1993), sendo utilizadas em um terço dos biocontroles fúngicos produzidos para o controle de fungos causadores de doenças na vegetação (STEYAERT *et al.*, 2003). Dentre essas, destaca-se o fungo *Trichoderma stromaticum* (SAMUELS *et al.*, 2000), isolado a partir de folhas secas de cacaueiros em Belém (PA), que tem sido utilizado sob a forma de biopesticida, o “Tricovab” (BASTOS, 1996), no controle biológico do fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*, o causador da doença vassourade-bruxa do cacaueiro (BASTOS, 1992). Resultados promissores em outros estudos demonstraram que essa espécie, através do micoparasitismo, pode reduzir em 99% a formação de basidiocarpos em vassouras de bruxa em contato com o solo e em 56% em vassouras presas à planta (BASTOS, 1996). Este biopesticida tem sido produzido e distribuído pela Unidade de Biocontrole do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC-CEPLAC, Ilhéus-BA) desde 2000. Quando pulverizado em lavouras, *T. stromaticum* germina e esporula podendo parasitar o fitopatógeno, competir com o mesmo por nutrientes e espaço, além de induzir resistência na

planta hospedeira (BASTOS, 1992). A utilização de Tricovab, apresentou uma rápida aceitação entre os agricultores de cacau, sendo não patogênico para humanos, animais ou plantas (POMELLA; SOUZA; NIELLA, 2007).

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

Estudos demonstraram que alguns fungos apresentam atividade antiparasitária como relatado por Campos e colaboradores onde encontraram que o extrato do fungo *Cochliobolus* sp. eliminou 90% das formas amastigotas de *Leishmania amazonenses in vitro* (CAMPOS *et al.*, 2008). A biomolécula fumagilina, isolada do fungo *Aspergillus*, interage com o *Plasmodium falciparum* inibindo o crescimento do parasito em experimentos *in vivo* e *in vitro* (CHEN *et al.*, 2009).

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

Recentemente, nosso grupo demonstrou que o extrato etanólico bruto do fungo *Trichoderma stromaticum* (ExtTs) diminuiu o crescimento de *P. falciparum* em eritrócitos humanos infectados e o tratamento com ExtTs de camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) foi capaz de aumentar a sobrevivência, prevenir sinais neurológicos evitando o desenvolvimento de malária cerebral experimental (CARIACO *et al.*, 2018).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com extrato do fungo *T. stromaticum* no controle de *T. gondii* e/ou inflamação provocado pela infecção oral pelo parasito em camundongos C57BL/6.

2 JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose, infecção ocasionada pelo protozoário *T. gondii*, constitui um sério problema de saúde pública, podendo ser fatal em indivíduos imunocomprometidos ou em infecções congênitas. O padrão ouro utilizado no tratamento da toxoplasmose apresenta diversos efeitos colaterais sendo de extrema importância o estudo de novos compostos como tratamentos alternativos para esta infecção.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o uso do extrato etanólico bruto de *T. stromaticum* (ExtTs) na infecção oral por *T. gondii* em camundongos da linhagem C57BL/6.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a sobrevivência e perda de peso de camundongos C57BL/6 infectados oralmente com cistos de *T. gondii* e tratados com ExtTs;
2. Avaliar o parasitismo tecidual por imuno-histoquímica do intestino delgado, pulmão, fígado e cérebro de camundongos C57BL/6 infectados oralmente com cistos de *T. gondii* e tratados com ExtTs;
3. Avaliar as alterações histológicas e escore inflamatório do intestino delgado, pulmão e fígado de camundongos C57BL/6 infectados oralmente com cistos de *T. gondii* e tratados com ExtTs;
4. Quantificar o número de células caliciformes produtoras de mucinas, de células de Paneth e mastócitos no intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados oralmente com cistos de *T. gondii* e tratados com ExtTs;
5. Quantificar a fresco o número de cistos cerebrais durante a infecção crônica de camundongos C57BL/6 infectados oralmente com cistos de *T. gondii* e tratados com ExtTs;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Manutenção de culturas de *T. stromaticum* e preparação do extrato etanólico bruto (ExtTs)

O fungo *Trichoderma stromaticum* cepa ALF 64, utilizado na preparação do Tricovab® (Cepec-Ceplac), foi utilizado neste estudo e gentilmente cedido pela Dra. Jane Lima dos Santos (Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, Ilhéus- BA). O fungo foi cultivado em placas de Petri em meio Batata Dextrose Agar (BDA) em temperatura ambiente por 12 a 15 dias. Após esse período, os esporos de *T. stromaticum* foram coletados por lavagem da superfície micelial com etanol 95% (3mL/placa). A solução etanólica foi homogeneizada em agitador por 24 horas e congelada a -80°C. Após congelamento, a solução etanólica foi liofilizada (para que todo o líquido fosse retirado, processo de sublimação). O extrato bruto obtido foi pesado e ressuspense em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS). Após a ressuspensão, o extrato foi filtrado utilizando filtros descartáveis de 45µm, com a finalidade de remover impurezas presentes na solução. Finalmente, o extrato foi armazenado a - 20°C até o momento da sua utilização (FUKUZAWA *et al.*, 2008).

4.2 Manutenção e cuidados dos animais de experimentação

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, com 8 a 10 semanas de idade, provenientes da Rede de Biotérios e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR). Durante todo o procedimento experimental, os camundongos foram mantidos em condições livres de patógenos específicos, com temperatura, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlados, com livre acesso a água e ração. Todos os procedimentos experimentais nos animais assim como os protocolos deste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (Processo N° 110/11).

4.3 Cepa do parasita

A cepa ME-49 de *T. gondii* foi utilizada para infecção experimental dos animais neste trabalho. A manutenção da cepa foi feita por infecção por via intraperitoneal de camundongos da linhagem Swiss utilizando 10 cistos de *T. gondii*. Um mês após a inoculação, o cérebro foi coletado, macerado em 4 mL de PBS para posterior quantificação dos cistos a fresco no

microscópio de luz. Para os ensaios experimentais do presente trabalho, camundongos C57BL/6 foram infectados com 10 cistos de *T. gondii* em um volume final de 100 µl de PBS.

4.4 Manutenção e cuidados dos animais de experimentação

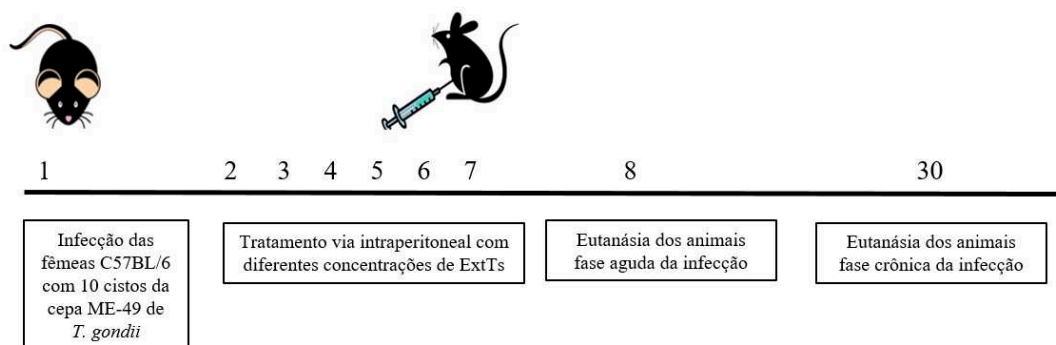
Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, com 8 a 10 semanas de idade, provenientes da Rede de Biotérios e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR). Durante todo o procedimento experimental, os camundongos foram mantidos em condições livres de patógenos específicos, com temperatura, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlados, com livre acesso a água e ração. Todos os procedimentos experimentais nos animais assim como os protocolos deste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (Processo N° 110/11).

4.5 Desenho experimental, coleta e processamento das amostras

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 foram infectados com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e tratados, a partir do 2º dia até o 7º dia de infecção, via intraperitoneal da seguinte maneira:

- Grupo tratado com 40mg de ExtTs /Kg/dia (10 animais)
- Grupo tratado com 100mg de ExtTs /Kg/dia (10 animais)
- Grupo tratado com 200mg de ExtTs /Kg/dia (10 animais)
- Grupo tratado com PBS (10 animais)

Metade dos animais de cada grupo foram eutanasiados no oitavo dia após infecção e a outra metade foi acompanhada para ensaio de mortalidade e contagem dos cistos a fresco. A sobrevivência e variação do peso dos animais foi acompanhada diariamente.



Para analisar os efeitos do ExtTs nos órgãos dos camundongos, um grupo de animais não infectados foi tratado intraperitonealmente com 200mg/kg/dia e eutanasiados conforme no 8º dia de infecção.

Com 8 e 30 dias de infecção (ou sem infecção), os camundongos foram anestesiados com cetamina (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil) / xilazina (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil) via intraperitoneal. As amostras de sangue foram coletadas através de punção do plexo retroorbital e depois centrifugadas a 500 x g durante 5 minutos para obtenção do soro. As amostras de soro foram armazenadas a -80 °C para posterior análise do perfil lipídico e citocinas. Em seguida, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para a coleta dos órgãos (fígado, pulmões, coração, cérebro e intestino delgado).

Após a coleta do intestino delgado, o mesmo foi dividido em quatro porções: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo; e processado como “rolo suíço” para as análises histológicas. O fígado, pulmões, cérebro e intestino delgado coletados foram fixados em formol tamponado a 10% e processados para inclusão em parafina. Após inclusão, foram feitos cortes histológicos, com uma espessura de 5µm no micrótomo RM 2125, (Reichert, Leica, Wetzlar, Alemanha) para posterior análise histológica. Os cortes de tecido foram montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (H & E) para quantificação das células de Paneth e análise do escore inflamatório; Azul Alcian para quantificação das células caliciformes e corante azul de toluidina para detecção de mastócitos (MCs) no intestino delgado. Os mastócitos, células caliciformes e células de Paneth foram quantificadas usando uma objetiva de 40 x em microscópio de luz de maneira as cegas. Os MCs foram quantificados em 200 campos microscópicos e foram observadas a presença de MCs granulados e degranulados. Para as células de Paneth, foram quantificadas três criptas por campo e 100 campos por segmento do intestino delgado, totalizando 400 campos por intestino. As células caliciformes foram pontuadas pela contagem do número de células coradas em 80 campos por segmento, 320 campos no total.

O escore inflamatório foi analisado em cortes histológicos de amostras de intestino delgado, fígado e pulmões corados com H & E; no intestino delgado todas as porções foram avaliadas segundo (BENEVIDES *et al.*, 2013), sendo representado como unidades arbitrárias: 0-2, leve; 2-4 moderado; 4-6 grave; e acima de 6, muito grave.

Imagens digitais do tecido pulmonar foram adquiridas mediante o microscópio Leica DM500 usando o programa Leica Application Suite / Versão 3.4.0. A porcentagem de área dos septos do pulmão foi avaliada pela medida da área de espessamentos dos septos alveolares mediante o programa NIH ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). De cada pulmão, 10 campos representativos não-sobrepostos foram avaliados usando objetiva de 10x. O número de focos inflamatórios no fígado foi quantificado em cortes histológicos, totalizando 20 campos por corte observados no microscópio de luz com uma objetiva de 10x. Ambas das análises foram realizadas às cegas com o mínimo de cinco camundongos para cada grupo experimental.

Os animais do ensaio de mortalidade (infecção crônica), foram monitorados diariamente até o 30º dia após infecção para a avaliação da perda de peso e taxa de sobrevivência (BARTLEY *et al.*, 2006), bem como quantificação dos cistos cerebrais.

4.6 Contagem de cistos cerebrais

Para análise e contagem dos cistos de *T. gondii* no cérebro, grupos de animais foram infectados e tratados com 40 ou 100 mg/kg/dia de ExtTs ou PBS (grupo controle) do 2º ao 7º dia de infecção. Trinta dias após a infecção, os animais foram eutanasiados, os cérebros removidos e divididos em duas partes iguais para contagem dos cistos em amostras a fresco e por ensaio de imunohistoquímica. Resumidamente para contagem à fresco, um hemisfério cerebral de cada animal foi homogeneizado em 2 mL de PBS passando através da agulha 27G. Em seguida, 20µL de homogeneizado cerebral foram colocados em lâminas microscópicas para quantificação de cistos por dois pesquisadores, em duplicata, de maneira às cegas. O número de cistos contados foi corrigido pela concentração na solução e multiplicado por dois para obter o número de cistos em todo o cérebro (CZARNEWKI *et al.*, 2017).

O outro hemisfério cerebral de cada animal foi processado para contagem de cistos pelo ensaio de imuno-histoquímica.

4.7 Reação de imuno-histoquímica para detecção de parasitos teciduais

Os parasitos teciduais foram detectados pela técnica de imunohistoquímica seguindo o protocolo descrito anteriormente com algumas modificações (BARENCO *et al.*, 2014).

Resumidamente, as lâminas com os cortes de tecidos desparafinados foram colocadas em uma câmara úmida e incubadas com peróxido de hidrogénio a 3% para bloquear a atividade da enzima peroxidase endógena. O resgate antigênico foi feito no micro-ondas por 7 minutos com tampão citrato (11mM - 0,21% em água destilada, pH 6). Para bloquear os sítios de ligação não específicos, os cortes foram incubados com leite desnatado a 0,3% (Molico; Nestlé, São Paulo, SP, Brasil) em PBS a temperatura ambiente. Para a detecção dos parasitos, os cortes foram incubados com soro anti - *T. gondii* (1:100) proveniente de camundongos Swiss infectados com cistos da cepa ME-49 diluído em 0,01% de saponina e sendo incubados os cortes *overnight* a 4°C. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo IgG biotinilado anti - camundongo (1:500) produzido em cabra (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) a 37°C por 1 hora. A sensibilidade da reação foi amplificada com o complexo avidina-biotina-peroxidase (1:100) (kit ABC, PK-4000 Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) a 37°C durante 30 minutos. A reação foi revelada com 0,03% de H₂O₂ junto com 3,3'-diaminobenzidinatetracloridrato (DAB; Sigma, Saint Louis, MO, EUA). Os cortes de tecido foram contra corados com hematoxilina de Harris, montados com lamínula e examinados no microscópio de luz usando uma objetiva de 40x às cegas. O parasitismo tecidual foi avaliado pela contagem dos cistos e vacúolos parasitóforos em toda a secção de tecido dos pulmões, fígado e intestino delgado.

4.8 Dosagem de lipídeos séricos

Os níveis de lipídeos séricos foram determinados utilizando kit comercial (Labtest Diagnóstica S.A. - Belo Horizonte, MG, Brasil). Brevemente, as amostras de sangue foram centrifugadas a 800x g durante 10 minutos e alíquotas de soro foram transferidas para tubos limpos. O colesterol total, as Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL) e as concentrações de triglicéridos nos soros foram mensurados seguindo as instruções do kit para cada parâmetro. Os níveis séricos de Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL) e Lipoproteína de muita Baixa Densidade (VLDL) foram estimados pela equação de Friedewald: $LDL = \text{Colesterol total} - HDL - \text{Triglicerídeos}/5$; sendo que: $\text{Triglicerídeos}/5 = VLDL$ (FRIEDEWALD *et al.*, 1972).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). A taxa de sobrevivência foi analisada pelo teste do Chi-quadrado; a perda de peso e o escore de morbidade foram analisados pelo teste *Two-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. Para comparações entre dois grupos foram utilizados o teste *t* de *Student* ou teste de Mann-Whitney para dados paramétricos e não paramétricos respectivamente. Para comparações múltiplas entre mais de dois grupos foi usado o teste *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni, ou teste de Kruskal-Wallis com a teste de múltiplas comparações de Dunn para dados paramétricos e não paramétricos respectivamente. Diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 O tratamento com ExtTs não interfere na sobrevivência e variação do peso corporal de camundongos infectados com *T. gondii*

Camundongos fêmeas C57BL/6 foram infectadas por via oral com 10 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e tratados com diferentes doses, 40, 100 ou 200 mg/kg/dia de extrato etanólico bruto de *T. stromaticum* do 2º ao 7º dia após a infecção, para verificar qual dose interferia no resultado da infecção por *T. gondii*. Os animais foram monitorados e pesados diariamente para análise da sobrevivência e avaliação do peso corporal. Verificamos que os animais tratados com 40 ou 100 mg/kg/dia de ExtTs apresentaram taxa de sobrevivência similar aos camundongos do grupo controle (infectados e tratados com PBS). Contudo, animais tratados com 200 mg/kg/dia de ExtTs apresentaram maior suscetibilidade à infecção por *T. gondii* quando comparados ao grupo controle (Figura 1A).

Em relação a variação do peso corporal, não foram observadas diferenças significativas entre os animais dos grupos tratados com diferentes concentrações do ExtTs e o grupo controle tratado com PBS (Figura 1B).

Como controle, um grupo de animais foi tratado com a maior concentração do ExtTs (200 mg/kg/dia) de acordo com o desenho experimental. Após 30 dias, os animais foram eutanasiados e os órgãos e soro coletados para análise. Não foi verificado nenhuma alteração histopatológica nos órgãos desses animais quando comparados aos animais tratados somente com PBS (dados não mostrados).

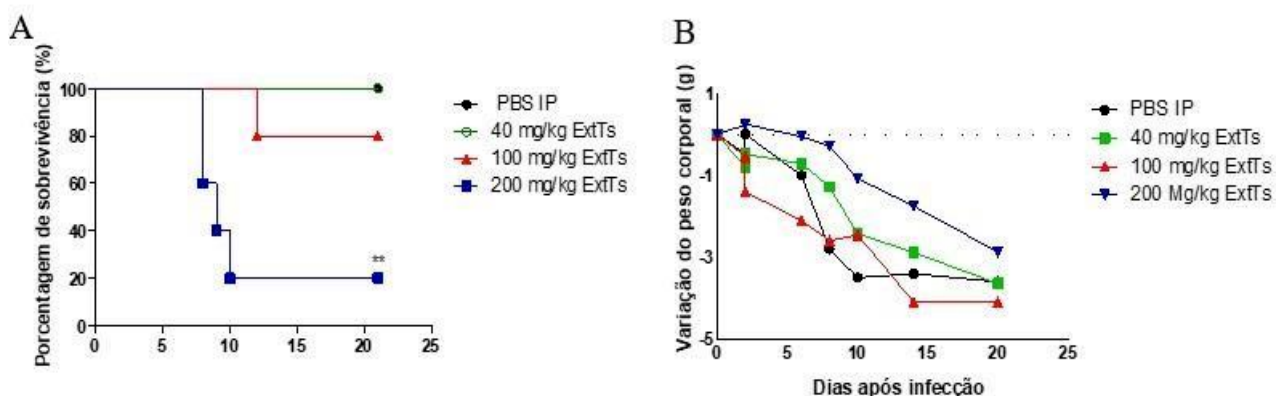


Figura 1. Avaliação da sobrevivência e variação do peso corporal de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* e tratados com ExtTs. Camundongos C57BL/6 fêmeas foram infectados por via oral com 10 cistos da cepa ME -49 de *T. gondii* e tratados intraperitonealmente com 40, 100 ou 200 mg/Kg de ExtTs. Os animais foram observados diariamente para avaliação da sobrevivência e alteração do peso corporal. (A) Sobrevivência de camundongos tratados com 40, 100 e 200 mg/kg/dia de ExtTs; (B) Variação do peso corporal de camundongos infectados e tratados com diferentes doses de ExtTs. A taxa de sobrevivência foi analisada pelo teste de Log-rank e chi square e a perda de peso por One -way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$. Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

6.2 O tratamento com ExtTs reduz o parasitismo intestinal e melhora a patologia intestinal de camundongos infectados com *T. gondii*

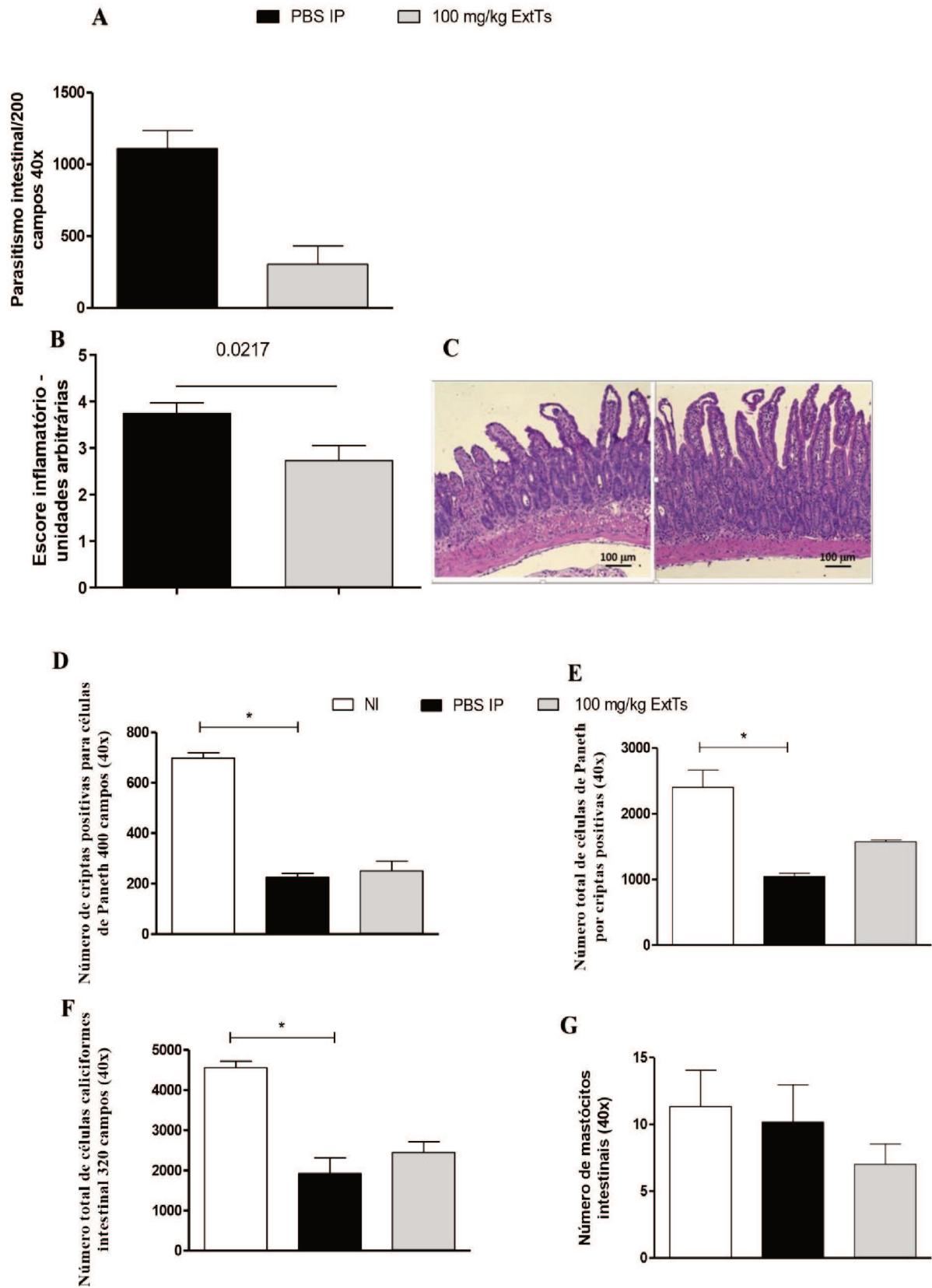
Os animais foram infectados com *T. gondii* por via oral e a carga parasitária no intestino delgado dos mesmos foi avaliada. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com 100 mg/kg/dia de ExtTs foi eficaz na diminuição do parasitismo intestinal quando comparado ao grupo controle (Figura 2A). No entanto, animais tratados com 40 mg/kg/dia ExtTs, não expressaram uma diminuição significativa (dados não mostrados). Com esses resultados, decidimos usar somente a concentração de 100 mg/kg/dia de ExtTs no tratamento dos animais experimentais em análises posteriores.

Cortes histológicos do intestino delgado foram analisados e observamos que camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* e tratados com PBS apresentaram focos de células inflamatórias na lâmina própria (LP) e na submucosa. Em algumas áreas, observamos o encurtamento e necrose das vilosidades (Figura 2B). Já os animais tratados com ExtTs, apresentaram menor alteração inflamatória bem como uma arquitetura epitelial mais preservada (Figura 2C).

Células de Paneth, caliciformes e mastócitos também foram avaliadas no intestino delgado de animais infectados e tratados com ExtTs. Realizamos a quantificação das criptas positivas para células de Paneth bem como o número dessas células em cada cripta positiva. Aqui observamos que o número de criptas positivas para células de Paneth e o número de células de Paneth em 400 criptas, diminuíram em camundongos infectados com *T. gondii* tratados ou não com ExtTs (Figura 2D). Verificamos também uma diferença significativa na quantidade dessas células entre os grupos não infectados e infectados. Estudos anteriores já relataram a diminuição das células de Paneth durante a infecção oral por *T. gondii*.

De forma interessante, o tratamento com 100 mg/kg/dia de ExtTs aumentou o número de células de Paneth em camundongos infectados em relação aos animais infectados e tratados com PBS (controle), apesar de não ser estatisticamente significativo (Figura 2E), sugerindo que o tratamento com extrato diminui a perda dessas células no intestino delgado.

Em relação ao número de células caliciformes e mastócitos totais, observamos em ambos os resultados, que a infecção por *T. gondii*, diminui a quantidade dessas células no intestino delgado e o tratamento com ExtTs não foi capaz de reverter essa condição (Figura 2F e G).



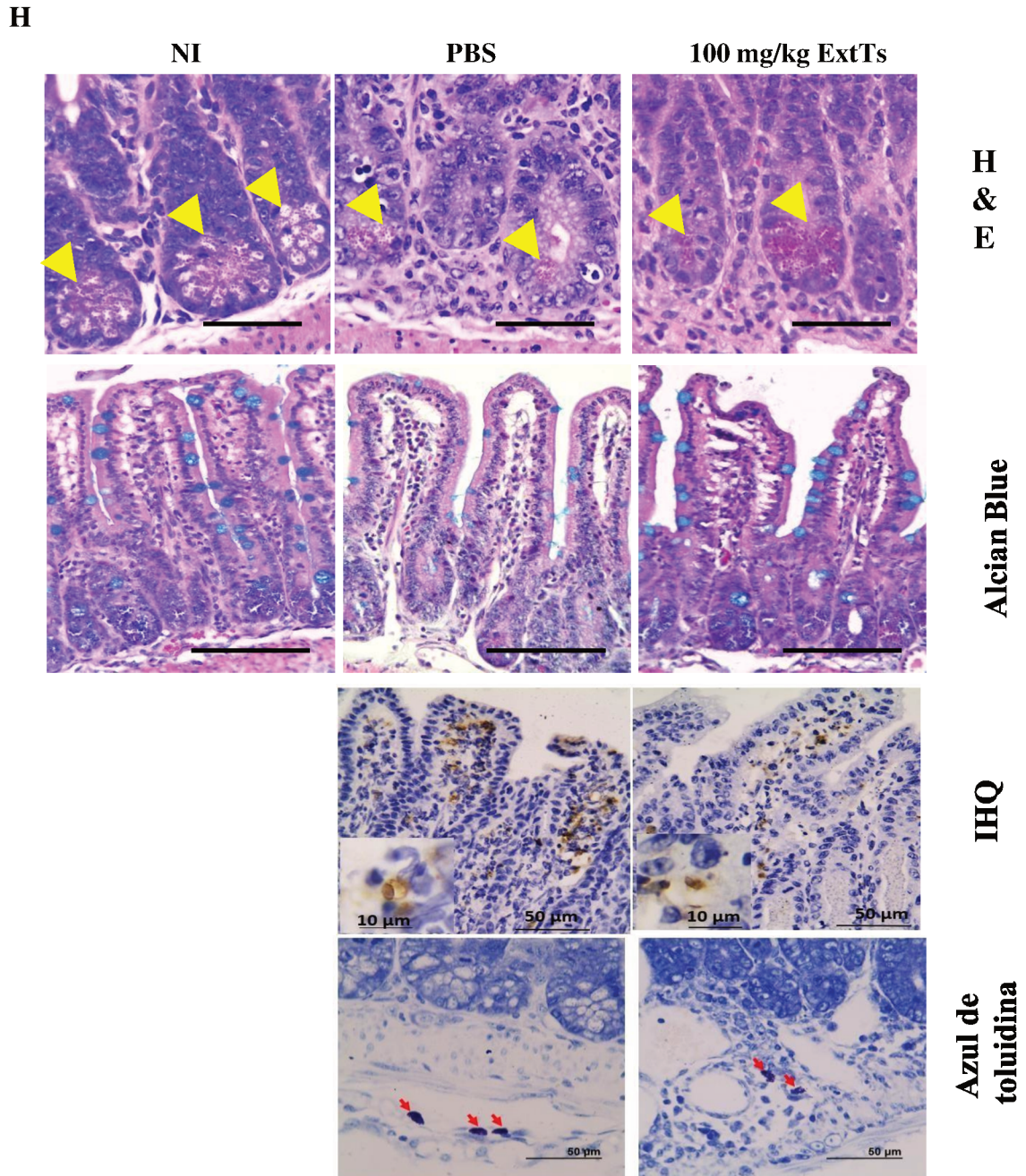


Figura 2. Avaliação do parasitismo tecidual, alterações histológicas e número de células de Paneth, caliciformes e mastócitos no intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados com *T. gondii* e tratados com ExtTs. Camundongos C57BL/6 fêmeas foram infectados por via oral com 10 cistos da cepa ME-49 de *Toxoplasma gondii* e tratados por via intraperitoneal com 100 mg/kg de ExtTs ou PBS estéril como controle. Um grupo de animais não infectado também foi avaliado. (A) Parasitismo intestinal, detectado por ensaio de imunohistoquímica e quantificado pela contagem do número de vacúolos parasitóforos e estruturas semelhantes a cistos em 50 campos microscópicos de cada segmento do intestino delgado (200 campos no total); (B) escore inflamatório; (C). Fotomicrografias representativas de alterações histológicas de camundongos tratados com PBS (esquerda) e tratados com 100 mg/kg de ExtTs (direita); (D) Quantificação de criptas positivas para células de

Paneth e (E) número total de células Paneth por cripta positiva em cortes histológicos corados com H&E (3 criptas por campo, 400 campos por intestino); (F) Número de células caliciformes em 320 campos por intestino (80 campos em cada porção intestinal); (G) Número total de mastócitos granulados e desgranulados em 200 campos por intestino (50 campos em cada porção intestinal); (H) Fotomicrografias representativas, na sequência: células de Paneth localizadas na base das criptas do intestino delgado e coradas por H&E, células caliciformes coradas pelo Alcian blue, parasitismo intestinal detectado pelo ensaio de imunohistoquímica e quantificação de mastócitos pela coloração de azul de toluidina. Os cortes histológicos foram analisados e quantificados em microscópio de luz objetiva de 40x. Os dados foram analisados pelo Teste t e One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Sidak. *: $p < 0,05$, Escala de barra: 50 e 100 μm . NI: não infectado.

6.3 O tratamento com ExtTs diminui as alterações inflamatórias no fígado e pulmões de camundongos infectados com *T. gondii*

Avaliamos o parasitismo tecidual e alterações inflamatórias no fígado e pulmões dos animais experimentais, para sabermos se o tratamento com ExtTs poderia interferir nesses parâmetros. Assim, observamos que o tratamento com ExtTs foi capaz de reduzir a carga parasitária no fígado, mas o mesmo não foi visto nos pulmões (Figura 3A-E).

Ao analisarmos as alterações inflamatórias no fígado, observamos que os animais infectados com *T. gondii* apresentaram focos inflamatórios constituídos por células mononucleadas espalhadas pelo parênquima e que o tratamento com ExtTs diminuiu o número desses focos inflamatórios quando comparado ao grupo controle (Figura 3B-C).

Nos pulmões, observamos que camundongos infectados com *T. gondii* apresentaram infiltrado inflamatório de células mononucleadas nos septos alveolares (Figura 3F). A intensidade das lesões pulmonares foi analisada mensurando-se a área do septo pulmonar e verificamos que não houve diferença significativa entre os grupos infectados tratados com ExtTs ou PBS (Figura 3D).

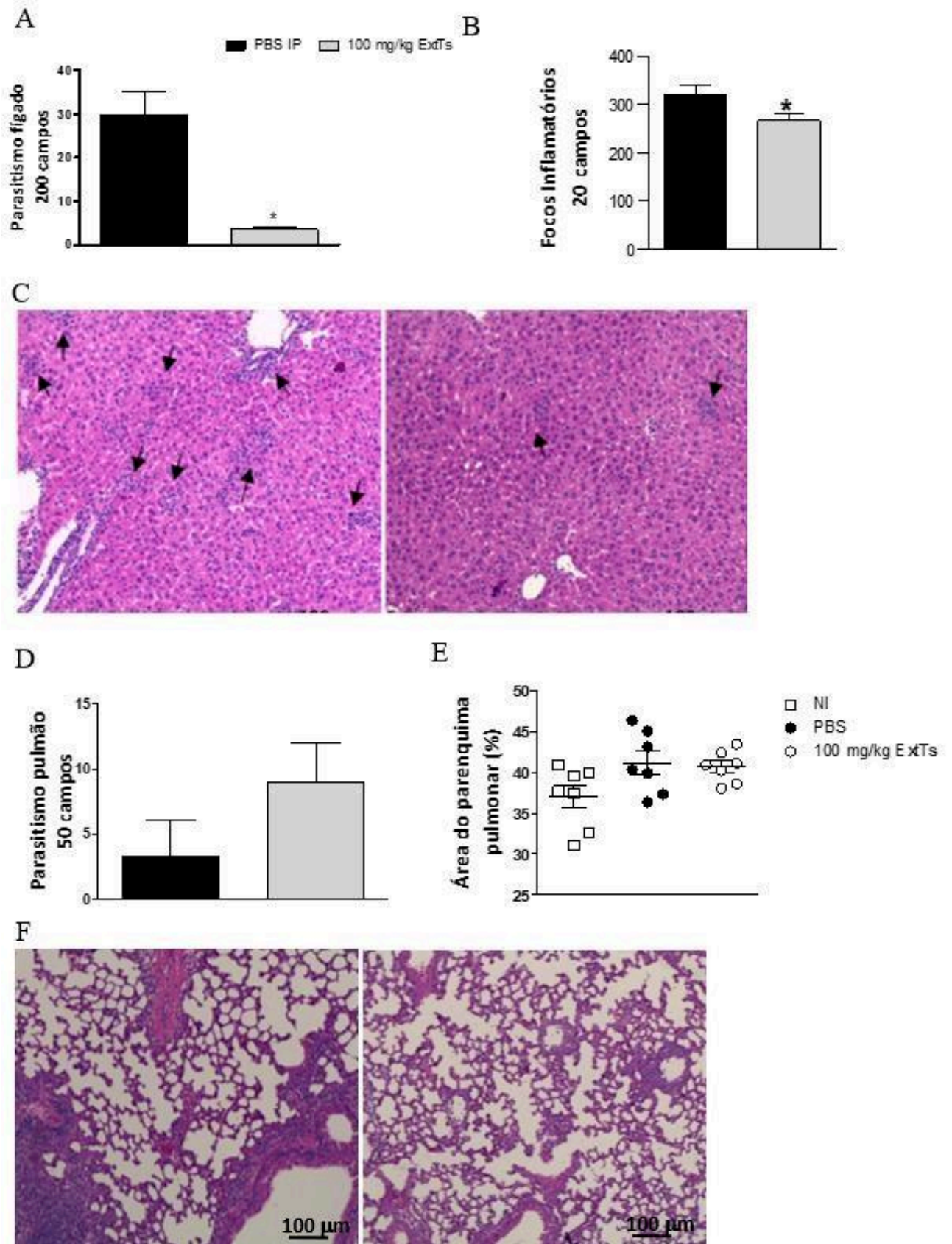


Figura 3. Avaliação da carga parasitária e parâmetros inflamatórios do fígado e pulmões de camundongos infectados com *T.gondii* e tratados com ExtTs. Os animais foram infectados com 10 cistos de *T. gondii* e tratados durante 6 dias com 100 mg/kg de ExtT ou PBS estéril, e eutanasiados aos 8 dias de infecção. O fígado e pulmões foram coletados e processados histologicamente. Quantificação dos parasitos pelo ensaio de imunohistoquímica no fígado (A) e pulmões (E); (B) O número de focos inflamatórios no fígado foi calculado pela quantificação desses em 20 campos microscópicos de tecido corado com H&E; (C) Fotomicrografias representativas de focos inflamatórios no fígado de camundongos tratados com PBS (esquerda) e tratados com ExtTs (direita); (D) Análise da área do parênquima pulmonar em cortes histológicos corados com H&E e analisados com o programa ImageJ. Os resultados foram expressos como porcentagem do parênquima pulmonar em relação à área total das imagens; (F) Fotomicrografias representativas de seções histológicas dos pulmões de camundongos tratados com PBS (esquerda) e tratados com ExtTs (direita). Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes, analisados pelo teste de Mann-Whitney ou t de Student. *: $p < 0,05$.

6.4 O tratamento com ExtTs influência o perfil lipídico sérico de camundongos infectados com *T. gondii*

Amostras de soro de animais infectados ou não com *T. gondii* e tratadas com ExtTs ou PBS, foram coletadas no oitavo dia de infecção para mensuração dos níveis lipídicos. Nossos resultados demonstraram que camundongos infectados tratados com PBS apresentaram altos níveis de VLDL e triglicérides. Em contraste, o tratamento com ExtTs foi capaz de manter essas frações dentro do nível de normalidade como visto nos camundongos não infectados (Figura 4D-E). Em relação aos níveis séricos de colesterol total e LDL, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 4A-C). Apesar de não ser estatisticamente significativo, a infecção pelo *T. gondii* tende a diminuir os níveis de HDL, independentemente do tratamento dos animais (Figura 4B).

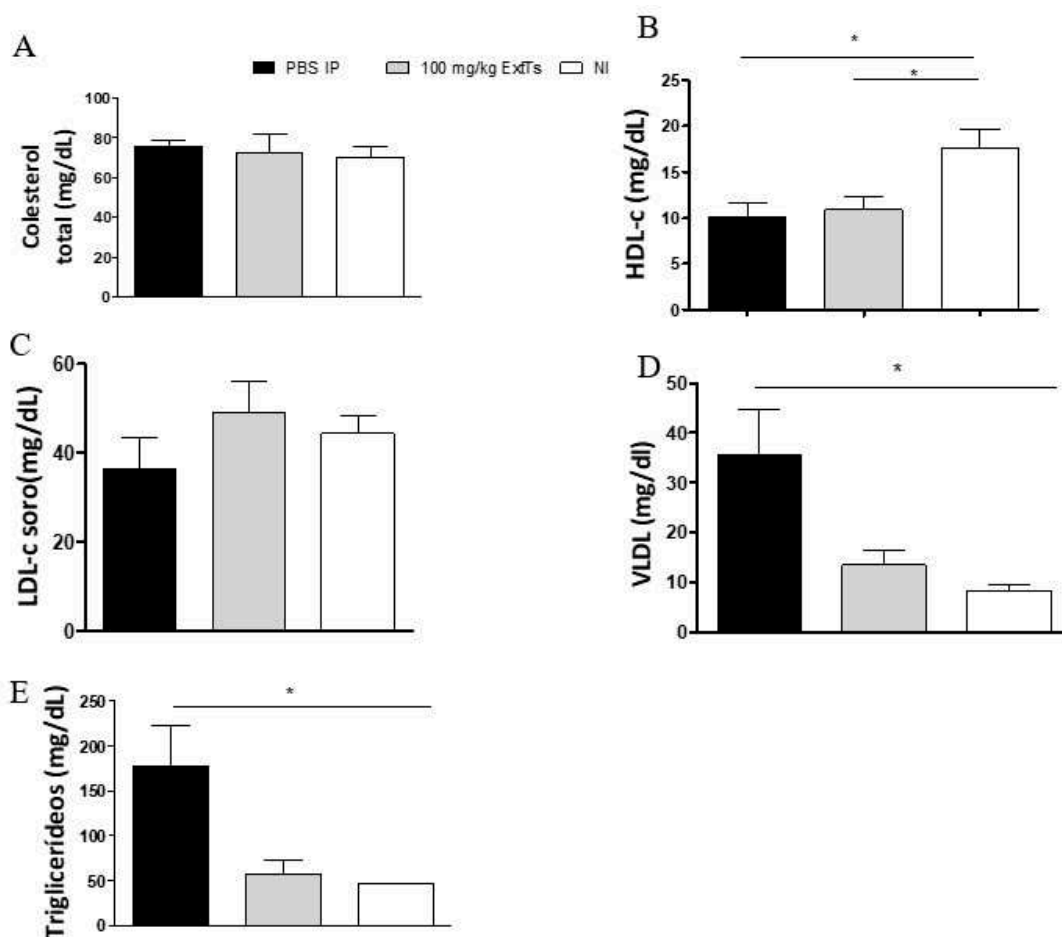


Figura 4. O tratamento com ExtTs interfere no perfil lipídico do soro de camundongos ‘infectados com *T. gondii* e tratados com ExtTs. Os animais foram infectados com 10 cistos de *T. gondii* e tratados durante 6 dias com 100 mg/kg de ExtT ou PBS estéril, e eutanasiados aos 8 dias de infecção. O soro dos animais foi coletado para mensuração das frações lipídicas conforme protocolo dos kits bioquímicos. (A) Concentração de colesterol total; (B) HDL-c; (C) LDL-c; (D) VLDL-c; e (E) Triglicerídeos. Dados são apresentados como a média de cada grupo $\pm$

erro padrão da média e são representativos de pelo menos dois experimentos independentes analisados pelo teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. *: $p < 0,05$.

6.5 O tratamento com ExtTs não interfere no parasitismo cerebral de camundongos cronicamente infectados com *T. gondii*

Para avaliarmos o efeito do tratamento com ExtTs no parasitismo cerebral em modelo de infecção crônica, camundongos C57BL/6 foram infectados com *T. gondii* e tratados com ExtTs ou PBS. Os animais foram monitorados diariamente e após 30 dias de infecção os mesmos foram eutanasiados e seus cérebros coletados. A detecção dos parasitos foi realizada pela contagem de cistos a fresco e ensaio de imunohistoquímica. Observamos que o tratamento com ExtTs apresenta uma tendência em diminuir a carga parasitária cerebral, mas não de maneira efetiva pois não observamos diferença estatística quando comparado ao grupo controle (Figura 5A, B).

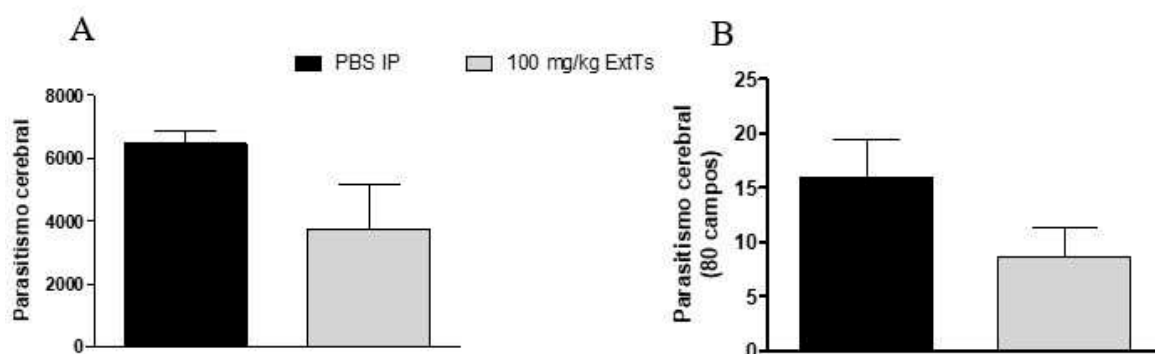


Figura 5: O tratamento com ExtTs não interfere no parasitismo cerebral de camundongos cronicamente infectados com *T. gondii*. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram infectados com *T. gondii* e tratados com 100 mg/kg de ExtTs ou PBS. Os animais foram monitorados diariamente e após 30 dias de infecção os mesmos foram eutanasiados e seus cérebros coletados. (A) A quantificação do parasitismo no cérebro de camundongos infectados com *T. gondii* foi realizada pela contagem de cistos a fresco em homogeneizados de tecido cerebral e por (B) ensaio imunohistoquímica em seção tecidual do cérebro. Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes analisados pelo teste One-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. *: $p < 0,05$.

7. DISCUSSÃO

O tratamento da toxoplasmose é frequentemente baseado em uma combinação de sulfadiazina e pirimetamina. A eficiência limitada, efeitos colaterais e tolerância microbiana a esses fármacos, impulsionam a pesquisa de novos agentes terapêuticos (Shubar et al., 2011). Em busca de novas abordagens para o tratamento da toxoplasmose, que apresentem um controle eficaz do parasita e menor toxicidade para o hospedeiro, e baseado em estudo recente do nosso grupo onde demonstramos que o tratamento com ExtTs foi capaz de melhorar a malária cerebral experimental (CARIACO *et al.*, 2018), aqui nos interessamos em conhecer o efeito do tratamento com extrato etanólico bruto do fungo *Trichoderma stromaticum* na infecção experimental por *T. gondii*.

Como previamente demonstrado por nosso grupo, o tratamento de camundongos machos C57BL/6, com doses de 100mg/kg/dia, em modelo de malária experimental, não interferiu na sobrevivência e morbidade desses animais (CARIACO *et al.*, 2018). Como o ExtTs não demonstrou efeito tóxico quando utilizado a 200 mg/kg/dia em camundongos fêmeas C57BL/6, testamos essa concentração de ExtTs em C57BL/6 fêmeas infectados ou não infectados com *T. gondii*, e acompanhamos diariamente a mudança de peso corporal e sobrevivência desses animais. Observamos que camundongos infectados por via oral com *T. gondii* e tratados intraperitonealmente com 200 mg/kg/dia durante 7 dias, apresentaram maior taxa de mortalidade que camundongos infectados e tratados com PBS, apesar da diminuição da carga parasitária intestinal na fase aguda da infecção (dados não mostrados). Por outro lado, os animais infectados e tratados com 100 mg/kg/dia, apresentaram mortalidade semelhante aos camundongos do grupo controle e menor parasitismo intestinal (fase aguda). Já o tratamento com 40 mg/kg/dia, não interferiu na taxa de mortalidade e nem no parasitismo intestinal (fase aguda), quando comparado aos camundongos infectados e tratados com PBS. Assim, os experimentos adicionais foram realizados com doses de 100 mg/kg/dia de ExtTs.

Em concordância, foi previamente demonstrado que o tratamento com ExtTs controlou *Plasmodium falciparum* de maneira dose-dependente em hemácias humanas infectadas, e além disso diminuiu a parasitemia na fase inicial da infecção experimental de camundongos C57BL/6 infectados pelo *P. berghei* ANKA (CARIACO *et al.*, 2018). Sabendo-se que *T. stromaticum* apresenta moléculas de peptaibols (trichostromaticina A-E TSM A-E e trichocompactina-XII (TCT XII) e que essas contribuem para a potente bioatividade do fungo contra patógenos de plantas (DEGENKOLB *et al.*, 2006), observamos que os constituintes presentes no ExtTs, estão contribuindo para controlar, mesmo que parcialmente, esses dois protozoários do filo Apicomplexa.

Como a infecção oral por *T. gondii* desenvolve imunopatologia em um grande número de espécies animais, além de camundongos (SCHREINER; LIESENFELD, 2009) e especificamente camundongos C57BL/6 desenvolvem patologia intestinal, mesmo quando infectados com baixa carga parasitária (ARAUJO *et al.*, 2013), no presente trabalho, avaliamos o efeito do tratamento com ExtTs na patologia do intestino delgado causada por *T. gondii* nestes camundongos suscetíveis. Verificamos que o tratamento com ExtTs foi eficiente em diminuir o parasitismo e a patologia intestinal. A patologia intestinal provocada pela infecção oral por *T. gondii* em camundongos C57BL/6, é mediada por uma forte resposta imune do tipo Th1 com um aumento de interferon gamma (IFN) - γ produzida por células T CD4⁺, fator de necrose tumoral- alfa (TNF- α) e óxido nítrico (NO) (LIESENFELD, B. O.; KOSEKFLLL; REMINGTON, 1996; LIESENFELD, O. *et al.*, 1999). Além disso, foi demonstrado que em áreas de lesões intestinais induzidas por *T. gondii*, há um aumento na proliferação de bactérias como *Escherichia coli* e *Bacteroides/Prevotella spp.* e ocorre a translocação de Enterobacteriaceae e Bacteroides spp. para a mucosa intestinal (HEIMESAAT *et al.*, 2006), favorecendo assim a patologia intestinal. Em estudos anteriores do nosso grupo, demonstramos que fagócitos murinos, estimulados com IFN- γ e LPS, e tratados com esporos de *T. stromaticum* diminuíram a *burst* respiratório e produção de óxido nítrico. Observamos também, uma diminuição na produção de IFN- γ e IL-10 pelas células do baço (ensaio *in vitro*) provenientes de camundongos BALB/c tratados por via intranasal com esporos de *T. stromaticum* (CARVALHO DE *et al.*, 2015). Juntos, esses resultados sugerem uma ação imunossupressora dos esporos de *T. stromaticum*, por suprimir mecanismos microbicidas e diminuir a resposta imune sistêmica reguladora e pró-inflamatória em camundongos (ALVES-FILHO *et al.*, 2011). Adicionalmente, Cariaco *et al.* demonstraram, em modelo experimental de malária, que o tratamento com ExtTs foi eficaz em diminuir as alterações inflamatórias no fígado, pulmões e cérebro, preservando a barreira hematoencefálica, diminuindo os níveis de expressão de IFN- γ , ICAM-1, VCAM-1 e CCR5 no cérebro (CARIACO *et al.*, 2018). Experimentos adicionais estão sendo realizados para esclarecer como o tratamento com ExtTs poderá estar interferindo no perfil de citocinas que medeiam a patologia durante a infecção por *T. gondii*.

No intestino delgado, as células de Paneth são especializadas na produção de α defensina, lisozima, lectinas do tipo C e fosfolipase A2 (PLA2), que são proteínas antimicrobianas importantes para manter a homeostase intestinal (KURASHIMA *et al.*, 2017), protegendo o intestino de patógenos entéricos (BEVINS; SALZMAN, 2011). A depleção de células de Paneth é uma consequência da infecção por *T. gondii* que envolve a ativação de uma forte resposta Th1 e uma alta produção de IFN- γ nos epitélios intestinais (ALVES *et al.*, 2018; RAETZ *et al.*,

2013). Além disso, a sinalização de IL-1 está envolvida na depleção das células de Paneth na infecção oral por *T. gondii*, provavelmente através do aumento da produção de IFN- γ (VILLERET *et al.*, 2013), levando a uma disbiose e imunopatologia durante a infecção oral por *T. gondii*. De forma interessante, em nosso trabalho experimental, observamos que apesar do tratamento com ExtTs não preservar o número de criptas positivas para células de Paneth, os animais infectados e tratados com ExtTs apresentaram maior quantidade de células de Paneth/criptas em comparação aos camundongos infectados e tratados com PBS, sugerindo que estas células podem estar controlando o crescimento excessivo de bactérias e melhorando a patologia intestinal. Estes resultados mostram a eficácia do ExtTs na manutenção da homeostase intestinal de animais infectados por *T. gondii*.

As células caliciformes são células de grande importância para manutenção da homeostase intestinal (KURASHIMA *et al.*, 2017), são responsáveis pela produção e liberação de mucinas que formam um filme que lubrifica e protege o epitélio intestinal (MILLER, H. R. P., 1987), assim analisamos este fenótipo celular no intestino delgado de camundongos C57BL/6 infectados por via oral com *T. gondii* e tratados com ExtTs. Estudos que relacionam as células caliciformes a infecção por *T. gondii* são escassos. Estudos anteriores demonstraram que camundongos infectados por via oral com oocistos da cepa ME-49 de *T. gondii* apresentaram número reduzido de células caliciformes secretoras de mucinas após a infecção pelo *T. gondii* (SCHNEIDER *et al.*, 2018). No presente estudo observamos que a infecção por *T. gondii* diminuiu o número de células caliciformes no intestino delgado e o tratamento com ExtTs não foi eficiente em preservar este fenótipo celular sob infecção. Assim, pensamos que a redução da imunopatologia no intestino delgado, dos animais infectados e tratados com ExtTs, não está sendo mediada pelas células caliciformes. Em relação aos mastócitos, estudos anteriores mostraram que quando os mastócitos são cultivados *in vitro* na presença de *T. gondii*, o parasita induz a desgranulação desse tipo celular, liberando leucotrienos e esses mediadores são capazes de controlar o parasita (HENDERSON; CHI, 1998). Em nosso trabalho experimental, não verificamos nenhuma diferença no número de mastócitos intestinais entre os grupos tratados com ExtTs e controle tratado com PBS.

O fígado é um órgão alvo importante no sistema de metabolismo dos organismos (YANG *et al.*, 2010). Poucos estudos concluíram uma análise sistemática do envolvimento de múltiplos órgãos na toxoplasmose aguda adquirida, mas sabe-se que a infecção por *T. gondii* pode afetar o fígado, baço e retina (NEVES *et al.*, 2009). Em nosso estudo, verificamos que o tratamento com ExtTs foi capaz de diminuir o parasitismo e os focos inflamatórios no fígado de camundongos infectados por *T. gondii*. Estudo recente relatou que camundongos tratados

extratos metanólicos de *Aloe vera* and *Eucalyptus* demonstraram uma redução no peso do fígado e atividade anti-oxidante causada pela infecção por *T. gondii* (MIRZAALIZADEH *et al.*, 2018). Nós também avaliamos o efeito do tratamento com ExtTs nos pulmões de camundongos infectados por *T. gondii* e observamos que o tratamento foi capaz de diminuir os focos inflamatórios nesse tecido quando comparado ao grupo controle, mas o mesmo não ocorre com o parasitismo pulmonar.

O colesterol (Chl) é considerado um esteróide, encontrado nas membranas celulares e transportado no plasma sanguíneo de todos os animais. É um componente essencial das membranas celulares de mamíferos. É absorvido pelo intestino e seu metabolismo envolve o transporte direto do esterol pré-formado do fígado na forma de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) para a periferia. Por outro lado, o Chl do tecido é transportado das células da periferia através do plasma ao fígado na forma de lipoproteína de alta densidade (HDL) (FIELDING; FIELDINST, 1995).

T. gondii é incapaz de sintetizar esteróis, colesterol, portanto, depende da absorção do colesterol do hospedeiro para seu próprio desenvolvimento (COPPENS; SINAI; JOINER, 2000) via endocitose mediada pelo receptor de LDL (COPPENS, 2006; COPPENS; SINAI; JOINER, 2000) ou através da proteína relacionada ao receptor de LDL (ISHIBASHI *et al.*, 1993). Este protozoário pode incorporar isoprenoides do metabolismo do colesterol do hospedeiro, usando-os para a síntese de membranas, especialmente o vacúolo parasitóforo (LI *et al.*, 2013; NISHIKAWA *et al.*, 2011). O colesterol é importante para os estágios de adesão, penetração e multiplicação intracelular (ADEWOLE *et al.*, 2011). Nishikawa *et al.*, sugeriram que o colesterol sintetizado via mevalonato do hospedeiro, poderia ser uma fonte importante para o crescimento de *T. gondii in vitro* (NISHIKAWA *et al.*, 2011). No presente estudo, observou-se que animais infectados com *T. gondii*, o colesterol total e o LDL não apresentaram diferença em relação aos animais não infectados. De maneira interessante, os animais tratados com ExtTs e infectados com *T. gondii* diminuíram os níveis de Triglicerídeos e VLDL em comparação com os camundongos infectados e tratados com PBS. Outros estudos, relataram que o uso do extrato aquoso de folhas de *A. muricata* foi capaz de diminuir os níveis de colesterol total, triglicerídeos e LDL aumentados pela estreptozotocina, uma droga que é usada para induzir o Diabetes mellitus experimentalmente (ADEWOLE *et al.*, 2011). As membranas de toxoplasma contêm colesterol que é principalmente derivado da lipoproteína de baixa densidade (LDL) internalizada nas células hospedeiras (COPPENS; SINAI; JOINER, 2000). A interferência com a endocitose das LDL, com a degradação lisossômica da LDL, ou com a

translocação do colesterol dos lisossomos bloqueia a liberação de colesterol para o vacúolo parasitóforo e reduz significativamente a replicação do parasita (COPPENS; SINAI; JOINER, 2000). Os dados apresentados sugerem que a manutenção dos níveis de triglicérides e VLDL por ExtTs em camundongos infectados com *T. gondii* pode estar envolvida no controle do parasita.

T. gondii é um patógeno Apicomplexa que afeta o sistema nervoso central (SNC), sendo o encéfalo o sítio mais comumente acometido durante infecção congênita e subsequente infecção crônica, que induz imunidade de longa duração contra a toxoplasmose (WOHLFERT; BLADER; WILSON, 2017). Na infecção crônica, os cistos teciduais são responsáveis pela transmissão para novos hospedeiros intermediários ou definitivos e também são importantes porque são impermeáveis aos medicamentos e podem evitar a destruição imunomediada (WEISS; KIM, 2000). De acordo com nossas investigações anteriores usando camundongos C57BL/6 (SILVA *et al.*, 2002), o pulmão e o SNC são importantes locais de replicação e morbidade de *T. gondii* nas fases aguda e crônica da infecção, respectivamente. Assim, avaliamos o efeito do tratamento com ExtTs na fase crônica da infecção. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com ExtTs não interfere, significativamente, na carga parasitária cerebral de camundongos infectados com *T. gondii*, apesar de observarmos uma tendência na diminuição do parasitismo nesse órgão.

CONCLUSÃO

O tratamento com ExtTs foi capaz de reduzir o parasitismo tecidual e as alterações inflamatórias no intestino delgado e fígado de camundongos infectados com *T. gondii*. Além disso, o tratamento também foi eficaz na redução das frações lipídicas essenciais para o crescimento do parasita. Com base nesses resultados, o extrato de *Trichoderma stromaticum* poderia ser uma terapia complementar no tratamento convencional da toxoplasmose.

REFERÊNCIAS

- ADEWOLE, S. O. et al. Hypoglycaemic and hypotensive effects of *Ficus exasperata vahl.* (Moraceae) leaf aqueous extract in rats. African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM, v. 8, n. 3, p. 275-83, set. 2011. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i3.65290>
- ALVES-FILHO, E. R. et al. The biocontrol fungus *Trichoderma stromaticum* downregulates respiratory burst and nitric oxide in phagocytes and IFN-gamma and IL-10. Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues, v. 74, n. 14, p. 943-958, 2011. <https://doi.org/10.1080/15287394.2011.573747>
- ALVES, D. R. et al. Leishmanicidal and fungicidal activity of lipases obtained from endophytic fungi extracts. PLOS ONE, v. 13, n. 6, p. e0196796, 18 jun. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196796>
- ANDERSON, A. C. Targeting DHFR in parasitic protozoa. Drug Discovery Today, v. 10, n. 2, p. 121-128, 2005. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03308-2](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03308-2)
- ANDRADE, W. A. et al. Combined action of nucleic acid-sensing toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. Cell Host and Microbe, v. 13, n. 1, p. 42-53, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.12.003>
- ARAÚJO, E. C. et al. Heme oxygenase-1 activity is involved in the control of *Toxoplasma gondii* infection in the lung of BALB/c and C57BL/6 and in the small intestine of C57BL/6 mice. Veterinary Research, v. 44, n. 1, p. 1-14, 2013. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-89>
- BENEVIDES, L. et al. *Toxoplasma gondii* Soluble Tachyzoite Antigen Triggers Protective Mechanisms against Fatal Intestinal Pathology in Oral Infection of C57BL/6 Mice. PLoS ONE, v. 8, n. 9, p. 1-14, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075138>
- BASTOS, C.N. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis perniciosa*. Brazilian phytopathology. v. 21, p. 50-54. 1996. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR9604989>
- BEVINS, C. L.; SALZMAN, N. H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. Nature Reviews Microbiology, v. 9, p. 356, 22 mar. 2011. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2546>
- BLADER, I. J.; MANGER, I. D.; BOOTHROYD, J. C. Microarray Analysis Reveals Previously Unknown Changes in *Toxoplasma gondii*-infected Human Cells. Journal of Biological Chemistry, v. 276, n. 26, p. 24223-24231, 2001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100951200>
- BOOTHROYD, J. C.; DUBREMETZ, J. F. Kiss and spit: The dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. Nature Reviews Microbiology, v. 6, n. 1, p. 79-88, 2008. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1800>

- BRUNET, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacology*, v. 1, n. 8, p. 1457-1467, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00090-X)
- BUTCHER, B. A. et al. Cutting Edge: IL-10-Independent STAT3 Activation by *Toxoplasma gondii* Mediates Suppression of IL-12 and TNF- α in Host Macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 174, n. 6, p. 3148-3152, 2005. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3148>
- CAMPOS, F. F. et al. Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 2, n. 12, p. 1-11, 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000348>
- CAÑEDO-SOLARES, I. et al. Congenital Toxoplasmosis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 27, n. 5, p. 469-474, maio 2008. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31816591df>
- CARIACO, Y. et al. Ethanolic extract of the fungus *Trichoderma stromaticum* decreases inflammation and ameliorates experimental cerebral malaria in C57BL/6 mice. *Scientific Reports*, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19840-x>
- CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen. *Microbiology and Immunology*, v. 81, p. 111-122, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(01\)00201-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00201-7)
- CARVALHO DE, C. R. et al. Biological activities of ophiobolin K and 6-epi-ophiobolin K produced by the endophytic fungus *Aspergillus calidoustus*. *Natural Product Research*, v. 30, n. 4, p. 478-481, 2015. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1022777>
- CHARDÈS, T.; BOUT, D. Mucosal immune response in toxoplasmosis. *Research in Immunology*, v. 144, n. 1, p. 57-60, 1993. [https://doi.org/10.1016/S0923-2494\(05\)80100-2](https://doi.org/10.1016/S0923-2494(05)80100-2)
- CHEN, X. et al. Fumagillin and Fumarranol Interact with *P. falciparum* Methionine Aminopeptidase 2 and Inhibit Malaria Parasite Growth *In Vitro* and *In Vivo*. *Chemistry & biology*, v. 16, p. 193-202, 1 mar. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.01.006>
- CHEROUTRE, H.; LAMBOLEZ, F.; MUCIDA, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 7, p. 445-456, 2011. <https://doi.org/10.1038/nri3007>
- COLLAZO, C. M. et al. Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon- γ inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. *Journal of Experimental Medicine*, v. 194, n. 2, p. 181-187, 2001. <https://doi.org/10.1084/jem.194.2.181>
- COPPENS, I. Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis. *Cellular Microbiology*, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00647.x>
- COPPENS, I.; SINAI, A. P.; JOINER, K. A. *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor- mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *Journal of Cell Biology*, v. 149, n. 1, p. 167-180, 2000. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.1.167>

DANNEMANN, B. et al. Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. A randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. The California Collaborative Treatment Group. *Ann.Intern.Med.*, v. 116, n. 1, p. 33-43, 1992. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-116-1-33>

DE OLIVEIRA, T. C. 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. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.04.010>

DEBIERRE-GROCKIEGO, F. et al. *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositols upregulate major histocompatibility complex (MHC) molecule expression on primary murine macrophages. *Innate Immunity*, v. 15, n. 1, p. 25-32, 2009. <https://doi.org/10.1177/1753425908099936>

DEFRANCE, T. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce antiCD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *Journal of Experimental Medicine*, v. 175, n. 3, p. 671-682, 1 mar. 1992. <https://doi.org/10.1084/jem.175.3.671>

DEGENKOLB, T. et al. Peptaibiotics: Screening for polypeptide antibiotics (peptaibiotics) from plant-protective *Trichoderma* species. *Chemistry and Biodiversity*, v. 3, n. 6, p. 593- 610, 2006. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200690063>

DENKERS, E Y et al. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, v. 159, n. 4, p. 1903 LP - 1908, 15 ago. 1997. <http://www.jimmunol.org/content/159/4/1903.abstract>.

DENKERS, ERIC Y. From cells to signaling cascades: Manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 39, n. 3, p. 193-203, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00279-7](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00279-7)

DUBEY, J. P. GENNARI, S. M. et al. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. [S.l: s.n.], 2012. v. 139. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000765>

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, v. 39, n. 8, p. 877-882, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.005>

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.267>

DUNAY, I. R. et al. Treatment of Toxoplasmosis: Historical Perspective, Animal Models, and Current Clinical Practice. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 31, n. 4, p. e00057-17, 1 out. 2018. <https://doi.org/10.1128/CMR.00057-17>

EGAN, C. E.; COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. Immunology and Cell Biology. [S.l: s.n.] 2012.
<https://doi.org/10.1038/icb.2011.93>

FIELDING, C.J.; FIELDING, P.E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* v.36, n.2, p.211-228, 1995. <http://www.jlr.org/content/36/2/211.long>

FILISETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita*, v. 40, n. 1, p. 71-80, 2004.
<http://www.iss.it/binary/publ/publi/40171.1107854946.pdf%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15269455>.

FOROUTAN-RAD, M. et al. Toxoplasmosis in Blood Donors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 30, n. 3, p. 116-122, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.tmr.2016.03.002>

FOURMAUX, M. N. et al. The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 83, n. 2, p. 201-210, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(96\)02773-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02773-9)

GALVÁN-RAMÍREZ, M. DE LA L. et al. Effect of nitaxozanide and pyrimethamine on astrocytes infected by *Toxoplasma gondii* in vitro. *Archives of Medical Research*, v. 44, n. 6, p. 415-421, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.07.002>

GAZZINELLI, M. F. et al. The impact of two education methods on knowledge of schistosomiasis transmission and prevention among schoolchildren in a rural community in northern Minas Gerais, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. SUPPL. 1, p. 45-53, 2006.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000900008>

GAZZINELLI, R T et al. HIV infection suppresses type 1 lymphokine and IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* but fails to inhibit the synthesis of other parasite-induced monokines. *The Journal of Immunology*, v. 155, n. 3, p. 1565 LP - 1574, 1 ago. 1995.
<http://www.jimmunol.org/content/155/3/1565.abstract>.

GAZZINELLI, R T et al. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *The Journal of Immunology*, v. 157, n. 2, p. 798 LP - 805, 15 jul. 1996.
<http://www.jimmunol.org/content/157/2/798.abstract>.

GAZZINELLI, R T et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 153, n. 6, p. 2533-43, 1994. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7915739>.

GAZZINELLI, RICARDO T. et al. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: An evolutionary tale of mice, cats, and men. *Cell Host and Microbe*, v. 15, n. 2, p. 132-138, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.004>

HAMPTON, M. M. Congenital Toxoplasmosis: A Review. *Neonatal Network*, v. 34, n. 5, p. 274-278, 1 set. 2015. <https://doi.org/10.1891/0730-0832.34.5.274>

SUNDY, J. S. Bioaerosols and innate immune responses in airway diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, v. 4, n. 5, 2004. <https://doi.org/10.1097/00130832-200410000-00006>

HAVAUX, X. et al. A new mouse model of lung allergy induced by the spores of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum* molds. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 139, n. 2, p. 179-188, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02679.x>

HEIMESAAT, M. M. et al. Gram-Negative Bacteria Aggravate Murine Small Intestinal Th1Type Immunopathology following Oral Infection with *Toxoplasma gondii* . *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 12, p. 8785-8795, 2006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8785>

HENDERSON, W. R.; CHI, E. Y. The importance of leukotrienes in mast cell-mediated *Toxoplasma gondii* cytotoxicity. *The Journal of infectious diseases*, v. 177, n. 5, p. 1437-43, 1998. <https://doi.org/10.1086/517833>

HERRERA-ESTRELLA, A.; CHET, I. Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi. In: Altman A. ed. *Agricultural biotechnology*, Marcel /dekker Inc. p. 263-282, 1998. <https://doi.org/10.1201/9781420049275.pt2>

HUSKINSON, J.; THULLIEZ, P.; REMINGTON, J. S. Toxoplasma antigens recognized by human immunoglobulin A antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 12, p. 2632- 2636, 1990. <https://jcm.asm.org/content/28/12/2632.long>

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, 1 ago. 1993. <https://doi.org/10.1172/JCI116663>

JENNIFER A. PINARD MSN, RN, C-FNP. Maternal serologic screening for toxoplasmosis. *Journal of Midwifery and Women's Health*, v. 48, n. 5, p. 308-316, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1526-9523\(03\)00279-4](https://doi.org/10.1016/S1526-9523(03)00279-4)

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis - Recent developments. *Experimental Parasitology*, v. 124, n. 1, p. 10-25, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.013>

JUNG, C.; HUGOT, J.-P.; BARREAU, F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *International Journal of Inflammation*, v. 2010, p. 1-12, 2010. <https://doi.org/10.4061/2010/823710>

KANG, H.; REMINGTON, J. S.; SUZUKI, Y. Decreased Resistance of B Cell-Deficient Mice to Infection with *Toxoplasma gondii* Despite Unimpaired Expression of IFN- γ , TNF- α , and Inducible Nitric Oxide Synthase. The Journal of Immunology, v. 164, n. 5, p. 2629- 2634, 2000.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2629>

KELLY, M. N. et al. Interleukin-17 / Interleukin-17 Receptor-Mediated Signaling Is Important for Generation of an Optimal Polymorphonuclear Re. Infection and immunity, v. 73, n. 1, p. 617-621, 2005.
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.617-621.2005>

KIM, K.; WEISS, L. M. Toxoplasma: the next 100 years. Microbes and Infection, v. 10, n. 9, p. 978-984, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.009>

KURASHIMA, Y. et al. Mucosal mesenchymal cells: Secondary barrier and peripheral educator for the gut immune system. Frontiers in Immunology, v. 8, n. DEC, p. 1-8, 2017.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01787>

LANG, C.; GROSS, U.; LÜDER, C. G. K. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. Parasitology Research, v. 100, n. 2, p. 191-203, 2007. LI, Z. H. et al. *Toxoplasma gondii* Relies on Both Host and Parasite Isoprenoids and Can Be Rendered Sensitive to Atorvastatin. PLoS Pathogens, v. 9, n. 10, 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003665>

LIESENFELD, B. O.; KOSEKFLLL, J.; REMINGTON, J. S. Infection with *Toxoplasma gondii*. v. 184, n. August, 1996. <http://doi.org/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, 1999.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00237.x>

LYNCH, M. et al. Centers for Disease Control & Prevention (CDC). CDC, v. 55, n. Cdc, p. 1- 42, 2000. <http://www.jstor.org/stable/42000708>

MCCABE, R. E.; LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Effect of Murine Interferon Gamma on Murine Toxoplasmosis. Journal of Infectious Diseases, v. 150, n. 6, p. 961-962, 1 dez. 1984.
<https://doi.org/10.1093/infdis/150.6.961>

MILLER, C. M. et al. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. International Journal for Parasitology, v. 39, n. 1, p. 23-39, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.002>

MILLER, H. R. P. Gastrointestinal mucus, a medium for survival and for elimination of parasitic nematodes and protozoa. Parasitology, v. 94, n. S1, p. S77-S100, 1987.
<https://doi.org/10.1017/S0031182000085838>

- MIRZAALIZADEH, B. et al. Effects of *Aloe vera* and *Eucalyptus* methanolic extracts on experimental toxoplasmosis in vitro and in vivo. *Experimental Parasitology*, v. 192, p. 6-11, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.07.010>
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis seminar. *Lancet* (London, England), v. 363, n. 9425, p. 1965-76, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)
- MOWAT, A. M. I. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, v. 3, n. 4, p. 331-341, 2003. <https://doi.org/10.1038/nri1057>
- MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunological Reviews*, v. 240, n. 1, p. 269-285, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00992.x>
- NEVES, E. S. et al. Acute acquired toxoplasmosis: Clinical-laboratorial aspects and ophthalmologic evaluation in a cohort of immunocompetent patients. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 2, p. 393-396, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200039>
- NISHIKAWA, Y. et al. Host cholesterol synthesis contributes to growth of intracellular *Toxoplasma gondii* in macrophages. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 73, n. 5, p. 633-639, 2011. <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0496>
- PASSOS, S. T. et al. IL-6 Promotes NK Cell Production of IL-17 during Toxoplasmosis. *The Journal of Immunology*, v. 184, n. 4, p. 1776-1783, 2010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901843>
- PIFER, R.; YAROVINSKY, F. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. *Trends in Parasitology*, v. 27, n. 9, p. 388-393, 1 set. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.03.009>
- PIPER, J. M.; WEN, T. S. Perinatal Cytomegalovirus and Toxoplasmosis: Challenges of Antepartum Therapy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, v. 42, n. 1, 1999. <https://doi.org/10.1097/00003081-199903000-00014>
- PLATTNER, F. et al. Toxoplasma Profilin Is Essential for Host Cell Invasion and TLR11Dependent Induction of an Interleukin-12 Response. *Cell Host and Microbe*, v. 3, n. 2, p. 77- 87, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.01.001>
- PORTER, S. B.; SANDE, M. A. Toxoplasmosis of the Central Nervous System in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *New England Journal of Medicine*, v. 327, n. 23, p. 1643-1648, 3 dez. 1992. <https://doi.org/10.1056/NEJM199212033272306>
- RAETZ, M. et al. Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-Dependent IL-12 Response to *Toxoplasma gondii* Profilin . *The Journal of Immunology*, v. 191, n. 9, p. 4818-4827, 2013. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301301>

ROBERT-GANGNEUX, F. It is not only the cat that did it: How to prevent and treat congenital toxoplasmosis. *Journal of Infection*, v. 68, n. SUPPL1, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.09.023>

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.
<https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

SAMUELS, G. J. et al. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycological Research*, v. 104, n. 6, p. 760-764, 2000.
<https://doi.org/10.1017/S0953756299001938>

SAYLES, P. C.; GIBSON, G. W.; JOHNSON, L. L. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 3, p. 1026-1033, 2000.
<https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1026-1033.2000>

SCHNEIDER, L. C. L. et al. *Toxoplasma gondii* promotes changes in VIPergic submucosal neurons, mucosal intraepithelial lymphocytes, and goblet cells during acute infection in the ileum of rats. *Neurogastroenterology and Motility*, v. 30, n. 5, p. 1-9, 2018.
<https://doi.org/10.1111/nmo.13264>

SCHREINER, M.; LIESENFELD, O. Small intestinal inflammation following oral infection with *Toxoplasma gondii* does not occur exclusively in C57BL/6 mice: Review of 70 reports from the literature. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 2, p. 221-233, 2009.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200015>

SILVA, N. M. et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: Induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 2, p. 859-868, 2002.
<https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.859-868.2002>

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: Determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitology Research*, v. 107, n. 2, p. 253-260, 2010.
<https://doi.org/10.1007/s00436-010-1899-6>

STEYAERT, J. M. et al. Genetic basis of mycoparasitism: A mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, v. 31, n. 4, p. 281-291, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1899-6>

STUTZ, A. et al. Cell invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology*, v. 217, n. 1, p. 28-36, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.08.008>

SU, C. et al. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science*, v. 299, n. 5605, p. 414-416, 2003. <https://doi.org/10.1126/science.1078035>

SUBAUSTE, C. S.; KONIARIS, A. H.; REMINGTON, J. S. Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. The Journal of Immunology, v. 147, n. 11, p. 3955 LP - 3959, 1 dez. 1991. <http://www.jimmunol.org/content/147/11/3955.abstract>.

TAIT, E. D.; HUNTER, C. A. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, n. 2, p. 201-210, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200013>

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. 107-16, 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23885328%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3714202>.

WEISS, L. M.; KIM, K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library, v. 5, n. 4, 2000. <https://doi.org/10.2741/Weiss>

WOHLFERT, E. A.; BLADER, I. J.; WILSON, E. H. Brains and Brawn: Toxoplasma Infections of the Central Nervous System and Skeletal Muscle. Trends in Parasitology, v. xx, p. 1-13, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.001>

YAN, C. et al. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. Parasites and Vectors, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1432-6>

YANG, J. et al. Hepatoprotective Effects of Apple Polyphenols on CCl4-Induced Acute Liver Damage in Mice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, n. 10, p. 6525-6531, 2010. <https://doi.org/10.1021/jf903070a>

ZHAO, Y. et al. Virulent *Toxoplasma gondii* Evade Immunity-Related GTPase-Mediated Parasite Vacuole Disruption within Primed Macrophages. The Journal of Immunology, v. 182, n. 6, p. 3775-3781, 2009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804190>

ANEXOS



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 198/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 110/11

Projeto Pesquisa: "Avaliação do efeito da sensibilização nasal de camundongos C57BL6 com esporos do fungo *Trichoderma stromaticum* na infecção oral por *Toxoplasma gondii*".

Pesquisador Responsável: Neide Maria da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTA ESTÁ NO SITE.

Uberlândia, 22 de novembro de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU