



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas



Avaliação antitoxoplásmica do extrato etanólico e frações de
***Annona crassiflora* Mart.**

Isabela Arantes Luiz Trindade

Uberlândia
2019

ISABELA ARANTES LUIZ TRINDADE

Avaliação antitoxoplásmica do extrato etanólico e frações de
Annona crassiflora Mart.

Pesquisa monográfica apresentada como
trabalho de conclusão de curso, requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina, na Universidade Federal
de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto
Mineo.

Co-orientadora: Dr. Carolina Salomão

Uberlândia

2019

Avaliação antitoxoplásmica do extrato etanólico e frações de
Annona crassiflora Mart.

Pesquisa monográfica apresentada como
trabalho de conclusão de curso, requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina, na Universidade Federal
de Uberlândia.

Uberlândia, 5 de dezembro de 2019.

Prof.º. Dr.º. José Roberto Mineo

AGRADECIMENTOS

Inicio agradecendo a Deus pelos caminhos que coloca em minha vida e por me dar sabedoria para escolher sempre os melhores, nunca deixando que as pedras me impeçam de crescer.

Agradeço ao Prof. Dr. José Roberto Mineo pela oportunidade e pela confiança de me deixar trabalhar com um assunto da minha escolha. A todos do Laboratório de Imunoparasitologia da UFU que de alguma forma me ajudaram, em experimentos, com opiniões ou conselhos.

Sou extremamente grata a Carol Salomão, Tamires e Mariana que estiveram comigo em todo meu trabalho, vocês me ensinaram muito e espero um dia poder retribuir tanta bondade, as considero mais que colegas de laboratório, são amigas que moram em meu coração.

E por fim, meu maior agradecimento é para minha família, em especial a minha mãe, Vania, e a minha vó, Romilda, que fizeram de tudo para eu chegar até onde cheguei e ser quem sou hoje, sem elas nada disso seria possível. Obrigada por não me deixarem desistir e por sempre terem a palavra certa. Amo muito vocês e as dedico este trabalho.

RESUMO

Estima-se que aproximadamente 1/3 da população mundial esteja infectada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* e embora os indivíduos imunocompetentes sejam assintomáticos, os indivíduos imunodeficientes podem apresentar manifestações clínicas graves, dessa forma o estudo de medicamentos para o tratamento da toxoplasmose se torna necessário, uma vez que os medicamentos disponíveis apresentam efeitos colaterais indesejáveis. Nesse panorama, o estudo com plantas medicinais visando o tratamento de algumas protozooses tem obtido resultados promissores, e por isso, o presente estudo objetivou avaliar a capacidade anti-toxoplásmica de *Annona crassiflora* Mart., uma planta do cerrado brasileiro muito utilizada pela medicina popular. Para determinar a concentração ideal de uso e avaliar a citotoxicidade, macrófagos peritoneais de camundongo C57BL/6 foram tratados com diferentes concentrações de extrato etanólicos e frações de *A. crassiflora*. Em seguida avaliou-se a capacidade anti-toxoplásmica dos mesmos. As frações Diclorometano, n-Hexano e Acetato de etila reduziram significativamente a proliferação de *T. gondii*. A concentração inibitória (IC₅₀) foi determinada sendo IC<1µg/ml para o Diclorometano; IC=7,754 µg/ml para o n-Hexano e IC=34.16 µg/ml para o Acetato de etila. As três frações induziram a produção de NO, IL-12 e IL-10 em células infectadas, e também reduziram a exposição de fosfatidilserina na membrana celular do parasito, culminando na redução da proliferação do parasito *in vitro*. Avaliou-se a curva de mortalidade de animais infectados com as cepas RH e ME49 tratadas previamente com as frações. Observamos um aumento significativo na sobrevivência dos animais em relação ao controle, em especial o grupo em que o parasito foi tratado com a fração Diclorometano. Os resultados obtidos sugerem que as frações apresentam uma ação sob o parasito e que o tratamento da toxoplasmose com a fração Diclorometano de *A. crassiflora* pode constituir em uma alternativa promissora.

Palavras chaves: Toxoplasmose; Tratamento; Plantas do Cerrado; *Annona crassiflora*.

SUMÁRIO

RESUMO	4
1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3 JUSTIFICATIVA.....	11
4 METODOLOGIA	12
4.1 Obtenção do extrato bruto e frações de <i>Annona crassiflora</i> Mart.	12
4.2 Preparação do extrato	12
4.3 Cultivo de macrófago peritoneal	13
4.4 Obtenção do parasita	13
4.5 Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	14
4.6 Ensaio de proliferação intracelular por β -galactosidase.....	14
4.7 Determinação da IC50.....	15
4.8 Viabilidade Parasitária - Contagem de parasitas utilizando azul de trypan	15
4.9 Avaliação de fosfatidilserina	16
4.10 Dosagem de óxido nítrico	16
4.11 Dosagem de citocinas.....	17
4.12 Animais	17
4.13 Curva de mortalidade <i>in vivo</i> com pré tratamento de taquizoita de <i>T. gondii</i> das cepas RH 2F1 e ME49	18

4.14	ELISA para detecção de anticorpos	18
4.15	Pesquisa de cistos	19
4.16	Análise estatística	19
5	RESULTADOS	20
5.1	Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	20
5.2	Ensaio de proliferação intracelular por β -galactosidase	21
5.3	Determinação de IC50.....	22
5.4	Viabilidade parasitária.....	23
5.5	Avaliação de Fosfatidilserina	24
5.6	Avaliação do efeito do extrato e suas frações na produção de IL-10, IL-12 e NO em macrófagos.....	25
5.7	Dosagem de óxido nítrico (NO)	26
5.8	Dosagem de Citocinas	27
5.9	Curva de mortalidade in vivo com pré-tratamento do taquizoita de <i>T. gondii</i> da cepa RH e ME49.....	27
5.10	Detecção de anticorpos anti- <i>T.gondii</i>	28
5.11	Pesquisa de cistos	29
6	DISCUSSÃO.....	30
7	CONCLUSÃO	37
8	REFERÊNCIAS	38
	ANEXO I.....	42

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório, pertencente ao Filo Apicomplexa, e apresenta a capacidade de infectar animais de sangue quente, sendo seu hospedeiro definitivo são os felinos, onde o parasito realiza a fase sexuada de seu ciclo (NEVES, 2005). A soroprevalência difere entre os países, variando de 1% em alguns países do extremo Oriente até 90% em algumas partes dos países da Europa e da América do Sul (Flegr J. et al, 2014). As principais vias de infecção por *T. gondii* em humanos são consumo de carne crua ou malcozida contendo cistos, ingestão de oocistos esporulados no solo, água, vegetais não lavados ou mãos contaminadas e transmissão congênita. Em indivíduos imunocompetentes a infecção é considerada assintomática, entretanto em indivíduos imunodeficientes ela pode gerar várias manifestações clínicas, sendo comum em pacientes transplantados, portadores do vírus HIV, e em doenças crônicas (REIS M et al., 2018). Além disso, a infecção por *T. gondii* quando adquirida durante a gravidez, pode provocar aborto ou levar a toxoplasmose congênita, com graves consequências para o feto (CHAUDHRY et al, 2014).

Aproximadamente 1/3 da população mundial e cerca de 70% da população brasileira é soro reativa para *T. gondii*, por isso é de extrema importância o estudo de novas abordagens terapêuticas para o tratamento dessa doença. A resposta imune contra *T. gondii* é essencial para o controle da infecção, porém não é totalmente eficaz. A estimulação direta de macrófagos e células dendríticas pelo parasito via Toll Like Receptors (TLR) induz a produção de IL-12, promovendo uma resposta do tipo Th1 com produção de Interferon- γ (IFN- γ) pelos linfócitos T e pelas células NK. A produção de IFN- γ ativa macrófagos, que produzem mais TNF e liberaram espécies reativas do oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), inibindo a proliferação e sobrevivência do parasito. (BABAIE et al., 2017).

A resposta pró-inflamatória, caracterizada pelo perfil Th1, com alta produção de IFN- γ , é efetiva no controle de taquizoítos, entretanto, pode ser prejudicial ao hospedeiro. Dessa maneira, mecanismos imunomoduladores atuam para o equilíbrio entre respostas Th1 e Th2, sendo mediada especialmente pela IL-10, citocina anti-inflamatória que controla a inflamação (ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M., 2012).

Além da imunidade celular, anticorpos específicos desempenham um papel importante no controle da infecção por *T. gondii* através da ativação do sistema complemento, promovendo uma opsonização que aumenta a fagocitose e pela citotoxicidade dependente de anticorpo, permitindo, assim, que os parasitos sejam destruídos pelas células (SASAI M.; PRADIPTA A.; YAMAMOTO M., 2018). A produção de anticorpos específicos é feita a partir da ativação de linfócitos B por células T CD4⁺ (DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A., 2012). Anticorpos específicos da classe IgM são indicativos de fase aguda da doença e podem ser detectados após 5-14 dias de infecção, atingindo níveis elevados em um mês, porém, podem permanecer positivos por 18 meses ou mais. Os anticorpos da classe IgG são indicativos de fase crônica da infecção e podem aparecer após 8-12 dias de infecção, atingindo o pico máximo entre 6 -14 meses e declinando lentamente após esse período, podendo ser detectados durante toda a vida. (SANTANA, S. S., 2011).

O tratamento da toxoplasmose é recomendado em gestantes hipótese diagnóstica de transmissão congênita, em recém-nascidos infectados pelo parasito e em casos de pacientes imunodeprimidos e soropositivos para *T. gondii*. Os medicamentos mais utilizados são a sulfadiazina, pirimetamina, diaminodifinilsulfona, atovaquona, espiramicina e clindamicina. A opção terapêutica clássica para a toxoplasmose consiste na combinação de pirimetamina e sulfadiazina, que são drogas capazes de interromper o ciclo metabólico do parasito, através da inibição de enzimas, como a dihidropteroato sintase (DHPS) e

dihidrofolato redutase (DHFR), que participam da via da síntese de folato, importantes na formação de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e consequente replicação do parasito (SEPÚLVEDA-ARIAS; VELOZA; MANTILLA-MURIEL, 2014).

A combinação de pirimetamina e sulfadiazina provoca efeitos adversos significativos aos pacientes, como alterações hematológicas (anemia, trombocitopenia e leucopenia), reações de hipersensibilidade e também aumentam o risco de cálculos renais e complicações hepáticas, o que leva à interrupção do tratamento em aproximadamente 60% dos pacientes com AIDS (MONTAZERI et al., 2017). Esses medicamentos também não são recomendados durante o primeiro trimestre de gestação, devido à inibição da formação da medula óssea e sua natureza teratogênica (NASR et al., 2016).

Acredita-se que a resistência aos fármacos contribua para falhas no tratamento que ocorrem em aproximadamente 10% dos pacientes durante a terapia inicial. Dessa forma, é necessário mudanças na formulação dos medicamentos disponíveis clinicamente (ALDAY; DOGGETT, 2017). Novos recursos terapêuticos com efeitos adversos reduzidos e mais eficazes têm sido estudados, e a aplicação de plantas medicinais no tratamento de protozooses, como a toxoplasmose, tem demonstrado resultados promissores (SHARIF et al., 2016).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais é importante, devido à riqueza da biodiversidade, com cerca de 55 mil espécies de plantas. Apesar de toda a diversidade de espécies existentes, apenas uma pequena percentagem (0,4%) tem sido investigada fitoquimicamente (RODRIGUES; AMARAL, 2012). Segundo dados do Ministério da Saúde, a busca por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) mais que dobrou entre 2013 e 2015 (BRASIL, 2016). Os produtos naturais apresentam uma variedade estrutural única, proporcionando

oportunidade para a descoberta de novos compostos com ação terapêutica contra patógenos (SEPÚLVEDA-ARIAS; VELOZA; MANTILLA-MURIEL, 2014).

Annona crassiflora Mart., conhecida popularmente como Araticum, é uma planta do cerrado brasileiro que pertence à família das *Annonaceae*, muito utilizada em medicina popular (VILAR et al., 2018). As plantas do cerrado são ricas em compostos fenólicos, entre outros, que são os responsáveis diretos pela ação terapêutica. Diferentes estudos comprovaram que as substâncias bioativas presentes no fruto desta planta podem agir em diversos alvos fisiopatológicos, aliviando sintomas de doenças crônicas (BAILÃO et al., 2015). Suas sementes e folhas são empregadas no tratamento de câncer, picada de cobras e doenças sexualmente transmissíveis, seus frutos são consumidos como tônico e adstringentes e o pó da casca de seu tronco apresenta propriedades antifúngicas e antirreumáticas (VILAR et al., 2018). Já a casca de sua raiz, possui ação leishmanicida e tripanosomicidas (MESQUITA et al., 2005).

Os compostos fenólicos do Araticum estão localizados principalmente na casca do fruto, apresentando atividade antibacteriana, nematocida, antimalárica, antimutagênica, quimiopreventiva, anti-inflamatória, antiproliferativa em linhagens tumorais, anticolinesterásico, inseticida e larvicida (ARRUDA et al., 2018).

Sabendo que a casca do fruto é rica em compostos fenólicos e que estes são conhecidos pela sua ação terapêutica é válido estudar a ação antiparasitária desses compostos, em especial seus efeitos anti-*T. gondii*, uma vez que não se tem atualmente disponível um tratamento completamente satisfatório.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antitoxoplásmica do extrato etanólico e frações da casca do fruto de *Annona crassiflora* Mart.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a citotoxicidade do extrato e frações de *A. crassiflora* em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6.
- Determinar a influência do extrato e frações de *A. crassiflora* no índice de infecção e proliferação de *T. gondii* em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6.
- Avaliar a produção de NO e das citocinas IL-12 e IL-10 em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 tratados com frações de extrato etanólico de *A. crassiflora*.
- Avaliar a sobrevivência de camundongos infectados com as cepas RH e ME49 tratadas previamente com diclorometano, n-hexano e acetato de etila.
- Avaliar a produção de anticorpos dos animais 30 dias após a infecção com as cepas RH e ME49 tratadas com diclorometano, n-hexano e acetato de etila.
- Avaliar a presença de cistos cerebrais de animais infectados com a cepa ME49 tratada com diclorometano, n-hexano e Acetato de etila após 30 dias.

3 JUSTIFICATIVA

Os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da toxoplasmose apresentam efeitos colaterais indesejáveis, sabe-se que a toxoplasmose acomete 1/3 da população mundial e que a infecção por *T. gondii* pode promover desfechos letais em

indivíduos imunodeficientes e danos fetais em gestantes primo infectadas, dessa forma é de extrema importância buscar novas alternativas terapêuticas para esta doença.

Annona crassiflora possui potencial antimalárico, antileishmanicida e tem demonstrado eficiência no tratamento de diversas doenças, além de representar uma opção terapêutica menos tóxica que não gera tantos efeitos adversos ao paciente. Seu uso popular é bastante difundido e existe grande interesse econômico sobre sua exploração por ser uma planta abundante e característica de nosso país.

Por ser uma planta rica em diversos compostos, dentre eles os compostos fenólicos conhecidos por suas ações terapêutica, o presente estudo visa avaliar a atividade antitoxoplásmica do extrato etanólico e frações da casca de *Annona crassiflora* Mart.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção do extrato bruto e frações de *Annona crassiflora* Mart.

O extrato bruto e frações de butanol, n-hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa de *Annona crassiflora* Mart. foram cedidos pelo Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, do Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia ao Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia e preparado conforme descrito por JUSTINO et al. (2016).

4.2 Preparação do extrato

O extrato e frações foram diluídos em DMSO para preparação de uma solução mãe 50 mg/ml. A partir dessa solução mãe foram feitas quatro diluições em meio de cultura RPMI para preparação das soluções nas concentrações de 10^3 µg/ml, 10^2 µg/ml, 10 µg/ml e 1 µg/ml.

Essas diluições foram filtradas utilizando filtros estéreis (0,22 µm) para a realização dos experimentos *in vitro*.

4.3 Cultivo de macrófago peritoneal

Macrófagos peritoneais foram coletados após estímulo de 24 horas com Tioglicolato a 3%. Após a eutanásia, os camundongos foram pulverizados com álcool 70%, e procedida uma incisão na linha média do abdome, e 3 mL de meio de cultura RPMI foi inoculado no peritônio. Após massagear a região o fluido foi coletado e centrifugado a 400 x g, 10 minutos, 4°C. Em seguida, o sedimento de células foi ressuspensão e as células contadas e semeadas em placas específicas para cada ensaio.

4.4 Obtenção do parasita

Cepas de *T. gondii* (RH2F1 e ME49) foram mantidos em passagens regulares em sistema de cultivo celular, utilizando-se células de epitélio uterino da linhagem HeLa (ATCC CCL-2). As células foram cultivadas em frascos de cultura celular em meio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Inglaterra) suplementado com HEPES (25 mM), penicilina G (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), L-glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio (3 mM) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad-CA, EUA) em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C até atingirem a confluência. Neste momento, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii*, sendo estes transferidos em uma nova monocamada a cada 48-72 horas. Os parasitos livres foram coletados e parcialmente purificados por centrifugação diferencial (45 x g, 1 minuto, 4°C) para remover restos celulares. O sobrenadante foi coletado e centrifugado (700 x g, 10 minutos, 4°C). O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuspensionado em meio RPMI e os parasitos contados em câmara de Neubauer, utilizando o corante de exclusão vital azul de Tripan a 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA).

Suspensões parasitárias foram utilizadas para os experimentos *in vitro* e *in vivo*, e o restante foi armazenado a -20°C até a preparação do antígeno solúvel de *T. gondii*.

4.5 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

Os macrófagos peritoneais foram cultivados em placa de 96 poços (2×10^5 células/poço/200 μl) em RPMI suplementado com 10% de SFB (Cultilab), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100/ml estreptomicina (Sigma), durante 24 horas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO_2 . Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações (10^3 , 10^2 , 10 e 1 $\mu\text{g/ml}$) do extrato e frações de *Annona crassiflora* Mart., por mais 24 horas.

O ensaio de viabilidade celular foi realizado através da redução metabólica de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), pelo ensaio de MTT. Em cada poço de microplacas de cultivo celular foram adicionados um volume de 100 μl de MTT (0,5 mg/ml de MTT em meio RPMI) e incubadas por 4 horas a 37°C . Após esse período, o meio de cultura foi removido e adicionados 100 μl de solução 10% SDS e 50% N-dimetilformamida, afim de que o metabólito gerado, formazan, seja solubilizado. A leitura das microplacas foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm. A fórmula utilizada para calcular a inibição do crescimento celular é dada por $(\text{DO}_{\text{amostra}} / \text{DO}_{\text{controle}}) \times 100\%$.

4.6 Ensaio de proliferação intracelular por β -galactosidase

Macrófagos peritoneais foram cultivados em placa de 96 poços (2×10^5 /poço) por 24 horas em meio RPMI com 10% SBF a 37°C e 5% CO_2 . Em seguida as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* (cepa RH 2F1), pré tratados ou não com frações n-hexano, diclorometano e acetato de etila do extrato etanólico de *Annona crassiflora*, na proporção de 1,5 parasitas por célula. Após 24 horas de infecção, os sobrenadantes foram

descartados e adicionado 100 µl/poço de tampão RIPA que foi deixado por cerca de 15 minutos. Logo em seguida, adicionou-se a placa 160 µl/poço de tampão de ensaio e 40 µl/poço de substrato CPRG a 0,003M.

A placa ficou protegida da luz pelo tempo necessário para a reação de β-galactosidase se desenvolver. A leitura foi realizada em um leitor de placa a 570nm.

4.7 Determinação da IC50

A concentração inibitória foi determinada utilizando as frações n-hexano, diclorometano e acetato de etila do extrato etanólico de *Annona crassiflora* preparadas nas concentrações de 1,95 a 10³ µg/mL. O ensaio foi realizado como descrito no item 4.4. Após a distribuição das células nas placas e infecção com MOI 1,5, foi realizada uma diluição seriada em duplicata de cada fração avaliada. A leitura foi realizada após 18h de infecção. A determinação do IC50 foi feita através da fórmula: % Atividade inibitória (Ativ. Inib.) = 100 - (Abs fração X 100 / Abs. Controle positivo). Com os valores obtidos foi construído um gráfico de % Ativ. Inb. x Log(concentração em µg/ml).

4.8 Viabilidade Parasitária - Contagem de parasitas utilizando azul de trypan

Taquizoítas das cepas RH, mantidos em célula HeLa em cultura, foram contados divididos, igualmente, em cinco grupos (diclorometano, n-hexano, acetato de etila, meio e água). A concentração utilizada para as frações foi de 10µg/ml. Os parasitos foram colocados em contato com diclorometano, n-hexano, acetato de etila, meio e água e foram mantidos por 1 hora em estufa a 37°C e 5% CO₂, passado o tempo de tratamento os parasitas foram contados com auxílio de uma câmara de Neubauer e foram feitos cálculos para obtenção da porcentagem de viabilidade parasitaria e porcentagem de recuperação dos parasitas usados

para o experimento. O experimento foi realizado em triplicada e a contagem foi feita por 3 observadores.

4.9 Avaliação de fosfatidilserina

A exposição de fosfatidilserina (FS) na superfície celular indica apoptose celular, mas também está relacionado com mecanismo de evasão do parasita, conhecido como mimetismo apoptótico. Para avaliar a FS na superfície do parasita foi utilizado o kit BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, San Diego, CA). Suspensão de 10^6 taquizoítas da cepa RH foram tratadas por 1 hora com as frações n-hexano, diclorometano e acetato de etila do extrato bruto etanólico de *Annona crassiflora* e então serão ressuspensas em 200uL de Binding Buffer 1x e em seguida centrifugadas a 400g durante 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas novamente em 200uL de Binding Buffer 1x e centrifugadas a 400g durante 5 minutos a 4°C – a seguir o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas com Binding Buffer 1x/Annexina e incubadas no escuro por 15 minutos. A aquisição dos dados foi realizada antes de se completar uma hora da marcação no equipamento de citometria de fluxo FACSCANTO II (BD Biosciences, San Jose, CA).

4.10 Dosagem de óxido nítrico

Macrófagos, obtidos pelos protocolos citados no item 4.2.2, na proporção de 2×10^5 células por poço foram distribuídas em placas de 96 poços com meio RPMI completo a 37°C a 5% CO₂. Após esse período as células foram infectadas com parasitas, sendo 1,5 parasitas por célula da cepa RH pré-tratados ou não pelas frações n-hexano, diclorometano e acetato de etila do extrato etanólico de *A. crassiflora* na concentração de 10 µg, sendo as placas incubadas em estufa a 37°C a 5% CO₂, por 24h. Após as 24 horas, 50 µl de sobrenadante de

cada poço separadamente, foram adicionados (v/v) ao reagente de Griess (0,1% N-1-naphthyl-ethylenediamina em água destilada e 1% sulfanilamida em 5% ácido fosfórico) em placa de 96 poços. Valores de absorbância foram lidos a 570 nm em leitor de placa e a concentração de nitrito será calculada por comparação com uma curva padrão usando nitrito de sódio.

4.11 Dosagem de citocinas

Suspensões de macrófagos peritoneais foram distribuídas em placa de 96 poços (2×10^5 /poço), a qual permaneceu em estufa por 24h a 37°C e 5% CO₂. Após esse período, as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii*, na proporção de 1,5 parasitas por célula, pré-tratados ou não com as frações n-hexano, diclorometano e acetato de etila do extrato etanólico de *Annona crassiflora* e permaneceram por 24 horas em estufa a 37°C e 5%CO₂. Após esse tempo, ensaio de ELISA foi realizado para a dosagem das citocinas IL-12 e IL-10 no sobrenadante dessas culturas, utilizando reagentes comerciais de acordo com protocolos recomendados pelo fabricante (R&D Systems, Minneapolis, EUA; BD Biosciences, San Diego, EUA). Cada citocina teve sua quantificação estimada em uma curva de diluição seriada da respectiva proteína recombinante, e expressas em pg/ml.

4.12 Animais

Camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (WT), com 6-8 semanas de idade foram mantidos na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em ambiente com temperatura controlada (22-25°C) e alimento e água ad libitum. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU) sob o protocolo de número 109/16 (ANEXO D).

4.13 Curva de mortalidade *in vivo* com pré tratamento de taquizoita de *T. gondii* das cepas RH 2F1 e ME49

Parasitas da cepa RH e ME49 foram incubados com frações de n-hexano, diclorometano e acetato de etila por 1 hora em estufa a 37°C e 5% CO₂. Foi utilizada uma concentração de 10³ taquizoítas de RH por animal e 10⁵ taquizoítas de ME49 por animal. Os camundongos C57BL/6 foram infectados, via intraperitoneal, com 200µl da solução de parasitas pré tratados com frações do extrato de *Annona crassiflora* Mart. Os camundongos foram separados em 4 grupos, cada grupo contendo 5 animais: G1 - parasita pré tratado com meio; G2 – parasita pré tratado com fração de N-Hexano; G3 – parasita pré tratado com fração de Diclorometano e G4 – parasita pré tratado com fração de Acetato de Etila.

Os animais foram acompanhados, por 30 dias, para avaliação da perda ou ganho de peso dos grupos em que o parasita será tratado com frações do extrato em comparação ao grupo controle.

4.14 ELISA para detecção de anticorpos

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado para detectar anticorpos anti-*T. gondii* seguindo o protocolo já descrito com algumas modificações (SILVA et al., 2007). Após 30 dias de infecção os animais do experimento da curva de mortalidade que sobreviveram tiveram o sangue coletado e testado. Placas de 96 poços de alta afinidade foram sensibilizadas com antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg), por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas e os sítios inespecíficos bloqueados com leite em pó. Após novas lavagens, as amostras de soros dos camundongos infectados foram adicionadas, em duplicata, por 1 hora. As placas foram então lavadas e adicionou-se o anticorpo secundário marcado com peroxidase, passando por novo período de incubação. Após um ciclo final de lavagens, as placas foram reveladas pela adição do substrato enzimático com tampão cromógeno, incubado por 20-30 minutos à

temperatura ambiente e a densidade óptica determinada em leitor de placas. O ponto de corte da reação foi determinado pela média dos valores de DO dos soros controles negativos acrescido de três desvios padrões.

4.15 Pesquisa de cistos

Foi feita a contagem do número de cistos dos animais que foram infectados com taquizoítas da cepa ME49 no experimento da curva de mortalidade, para confirmação da infecção e quantificação do parasitismo. Após 30 dias de infecção os animais da curva de mortalidade foram eutanasiados e o cérebro foi coletado e macerado com auxílio de seringa e agulhas de 18G e 21G. Após obter uma consistência líquida, 25µl do macerado foi pipetado e colocado em lâmina coberta por uma lamínula, para a análise em microscópio óptico em aumento de 10x. A quantidade de cistos contados foi multiplicada por 25, representando assim a quantidade de cistos encontrados em um animal.

4.16 Análise estatística

A análise estatística e construção dos gráficos foi realizada utilizando o software Graph Pad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Para os dados paramétrico foi utilizado o One-way ANOVA e o pós-teste de Bonferroni, e para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal wallis seguido do pós-teste de Dunn. O teste de Kaplan-Meier foi utilizado para avaliar as curvas de mortalidade. Todos os resultados foram considerados significativos para um valor de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT e observou-se que todas as frações, em diferentes concentrações, exceto a concentração de 1:1 (1mg/ml) das frações n-hexano e diclorometano, mantêm mais de 50% de viabilidade celular. Dentre os componentes testados, os com maior citotoxicidade foram o extrato bruto, e as frações diclorometano e n-hexano (Figura 1). Considerando os resultados obtidos, a concentração de 1:100 (10µg/ml) foi escolhida para os demais experimentos realizados, por não apresentar efeito citotóxico significativo (Figura 1).

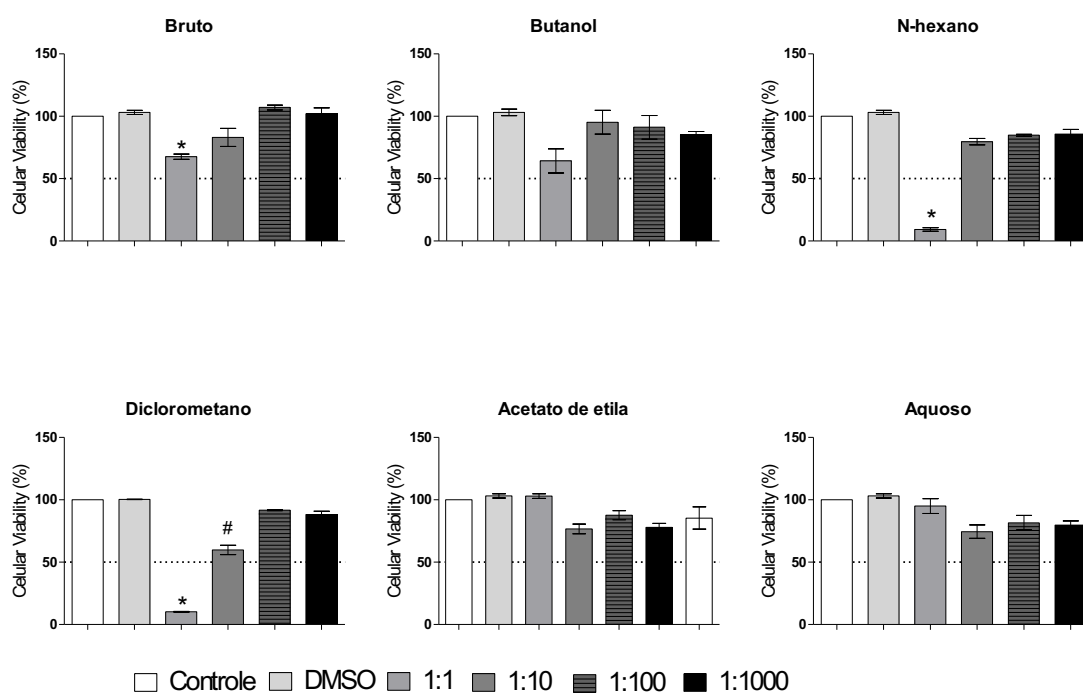


Figura 1 - Viabilidade celular de macrófago peritoneal tratado com concentrações de 10^3 , 10^2 , 10 e 1 µg/ml de extrato etanólico bruto e frações butanol, n-hexano, diclorometano, acetato de etila e Aquoso de *Annona crassiflora* Mart. * $p < 0,05$ (1:1 vs controle); # $p < 0,05$ (1:10 vs controle). Resultados estão expressos como Média $\pm$ DP.

5.2 Ensaio de proliferação intracelular por β -galactosidase

Utilizando a cepa RH 2F1 que apresenta a enzima β -galactosidase foi possível analisar a proliferação de *T. gondii* (RH 2F1). Foi realizado dois experimentos independentes. O primeiro em que os parasitos foram tratados antes da infecção e o segundo em que os parasitos e os compostos foram colocados concomitantemente na placa.

No primeiro experimento, os parasitos foram tratados com os diferentes extratos por uma hora, e em seguida foram colocados em cultivo de macrófago peritoneal para avaliar o efeito do extrato na proliferação do parasito. Observou-se que a proliferação dos parasitos tratados com as frações de n-hexano; diclorometano e acetato de etila foram reduzidas em relação ao controle (Figura 2A). No segundo experimento, a proliferação do parasito foi avaliada quando os extratos foram adicionados no momento da infecção (Figura 2B). Observamos que os mesmos extratos que reduziram a proliferação no ensaio anterior, também reduziram a proliferação quando o tratamento foi iniciado simultaneamente à infecção.

O tratamento prévio dos parasitos com as frações n-hexano; diclorometano e acetato de etila apresentou efeito antiproliferativo maior do que quando o tratamento foi realizado concomitante à infecção.

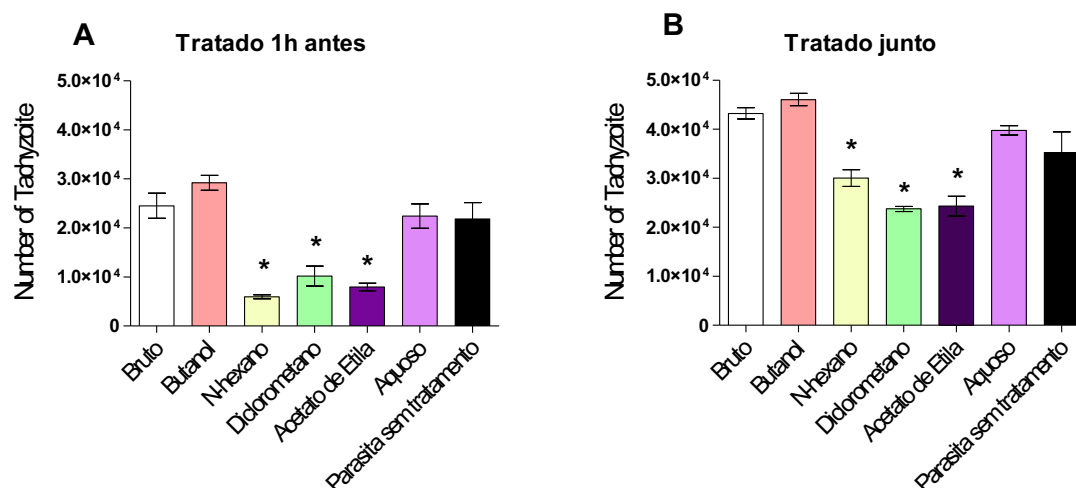


Figura 2 - Número de taquizoítas pós tratamento com extrato etanólico bruto e frações butanol, n-hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa de *Annona crassiflora* Mart. Tratado 1 hora antes da infecção (A) e Tratado concomitantemente à infecção (B). Resultados estão expressos como Média $\pm$ DP.

5.3 Determinação de IC₅₀

A concentração de inibição de 50% da atividade proliferativa do parasito foi realizada pelo ensaio da betagalactosidase utilizando a cepa modificada RH 2F1. Foi realizado os cálculos para obtenção da taxa proliferativa do parasito em diluições seriadas das frações, e foi possível observar as seguintes concentrações inibitórias: IC₅₀ < 1 µg/ml para o diclorometano; IC₅₀ = 7,754 µg/ml para o n-hexano e IC₅₀ = 34.16 µg/ml para o acetato de etila (Figura 3).

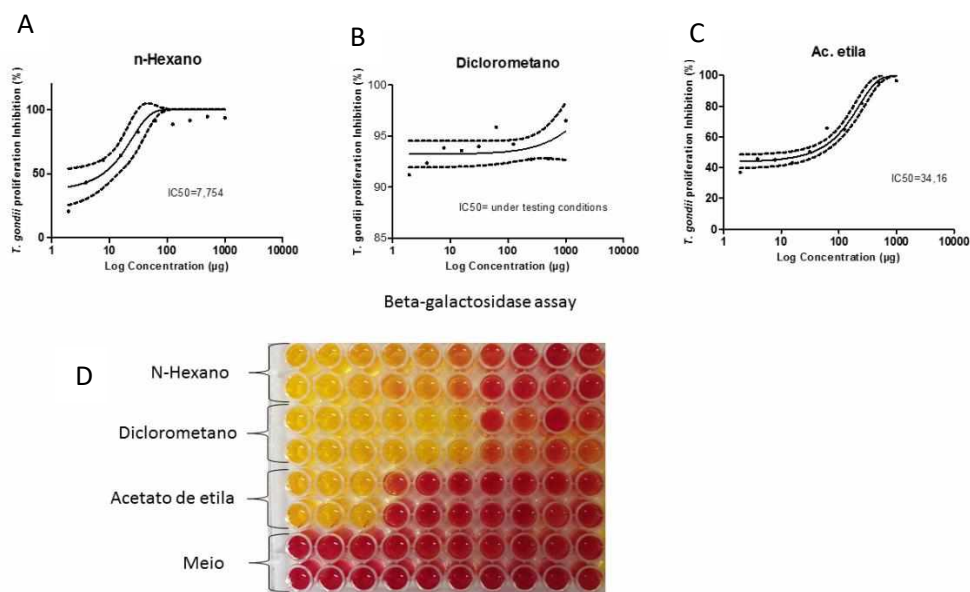


Figura 3 – Taxa de inibição de proliferação de *T. gondii* quando os parasitos foram cultivados com n-hexano (A); diclorometano (B) e acetato de etila (C). Imagem ilustrativa do ensaio colorimétrico de betagalactosidase (D).

5.4 Viabilidade parasitária

Para verificar se as frações n-hexano, diclorometano e acetato de etila estavam induzindo a morte do parasito, realizou-se o experimento de viabilidade parasitária que consistiu em calcular a porcentagem de parasitas vivos após uma hora de incubação com meio, com água ou com as frações n-hexano, diclorometano e acetato de etila. Pode-se observar que água promoveu a lise do parasita, enquanto o meio manteve a viabilidade celular. Nenhuma das frações reduziu significativamente a viabilidade do parasito, indicando que existe outro mecanismo relacionado à redução da proliferação celular observada na figura (Figura 4).

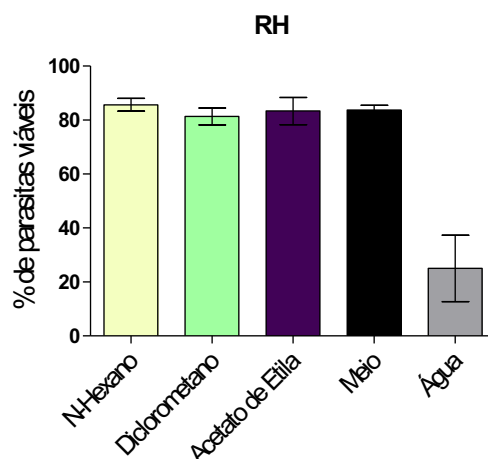


Figura 4 - Porcentagem de viabilidade parasitária da cepa RH após 1 hora de tratamento com meio, fração de n-hexano, diclorometano, acetato de etila e água. Resultados estão expressos como Média $\pm$ DP.

5.5 Avaliação de Fosfatidilserina

A exposição de fosfatidilserina (FS) na membrana celular indica que a célula está em processo de apoptose, entretanto *T. gondii* expõe a FS como mecanismo de escape da resposta imune, dessa forma o parasito será fagocitado e entra passivamente nas células.

Observou-se que quando o parasita é tratado por 1 horas antes da infecção com as frações de n-hexano, diclorometano e acetato de etila há uma redução, não significativa, da exposição de fosfatidilserina (Figura 5).

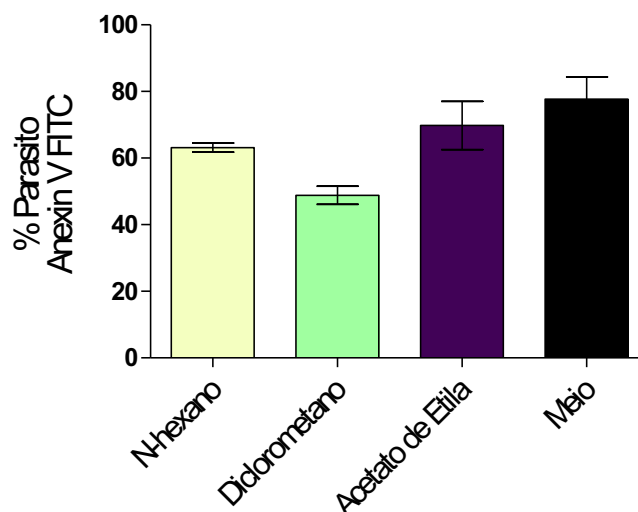


Figura 5 – Porcentagem de fosfatidilserina exposta na membrana do taquizoita de *T. gondii* pós tratamento com extrato etanólico bruto e frações Butanol, n-hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa de *Annona crassiflora* Mart. Resultados estão expressos como Média $\pm$ DP.

5.6 Avaliação do efeito do extrato e suas frações na produção de IL-10, IL-12 e NO em macrófagos

Macrófagos peritoneais foram distribuídos em placa de 96 poços e após 24 horas foram cultivadas com extrato de *A. crassiflora* e suas frações. Nenhum dos compostos induziu a produção de IL-10 (todas as amostras ficaram abaixo do limite de detecção), IL-12

ou NO (Figura 6). O controle positivo corresponde à infecção com parasitos da cepa RH (MOI 1,5).

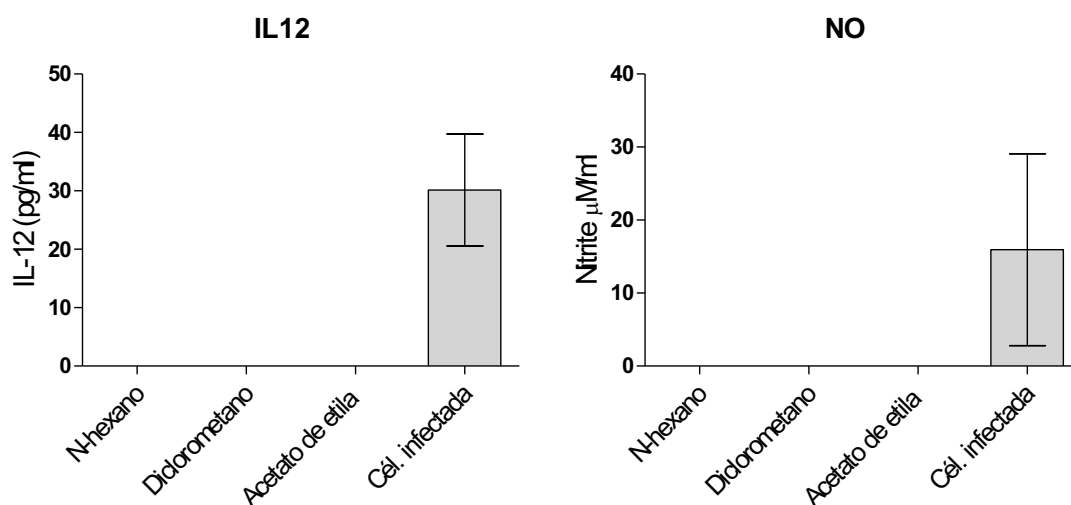


Figura 6 - Produção de IL-12 e Oxido Nítrico (NO) por macrófagos tratados com frações de n-hexano, diclorometano e acetato de etila do extrato bruto de *Annona crassiflora*. Resultados estão expressos como Média $\pm$ DP.

5.7 Dosagem de óxido nítrico (NO)

Utilizando o método de Greiss para detectar NO, observou-se que após infecção com o parasita, ocorreu uma produção significativa de NO pelo extrato etanólico bruto e frações de *Annona crassiflora* Mart. em relação aos controles (Figura 7).

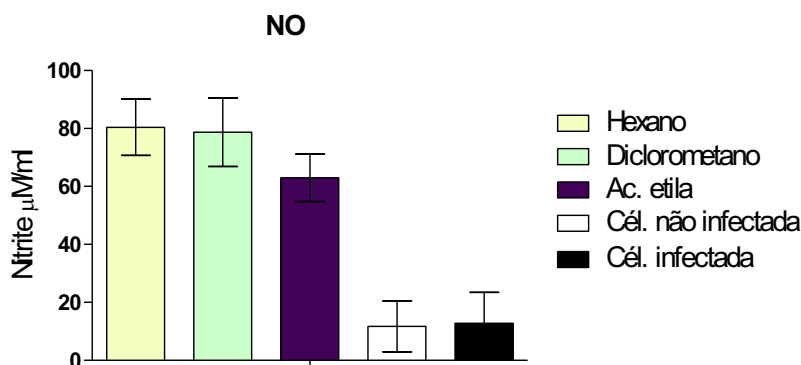


Figura 7 - Produção de Oxido Nítrico (NO) pelas células infectadas por taquizoítas de *T. gondii* tratados com as frações n-hexano, diclorometano, acetato de etila de *Annona crassiflora* Mart. Controle negativo (célula + Meio) e Controle positivo (RH 2F1). Resultados estão

5.8 Dosagem de Citocinas

Para avaliar o perfil da resposta imune das frações de *Annona crassiflora* frente a infecção por *T. gondii*, foi realizada a dosagem de produção de IL-12 e IL-10 quando o parasito foi tratado com as frações diclorometano, n-hexano e acetato de etila.

Foi possível observar que as três frações apresentam perfil de resposta Th1. A produção de IL-12 foi maior com o tratamento com diclorometano. Já a produção de IL-10 foi maior nas amostras tratadas com n-hexano, (Figura 8).

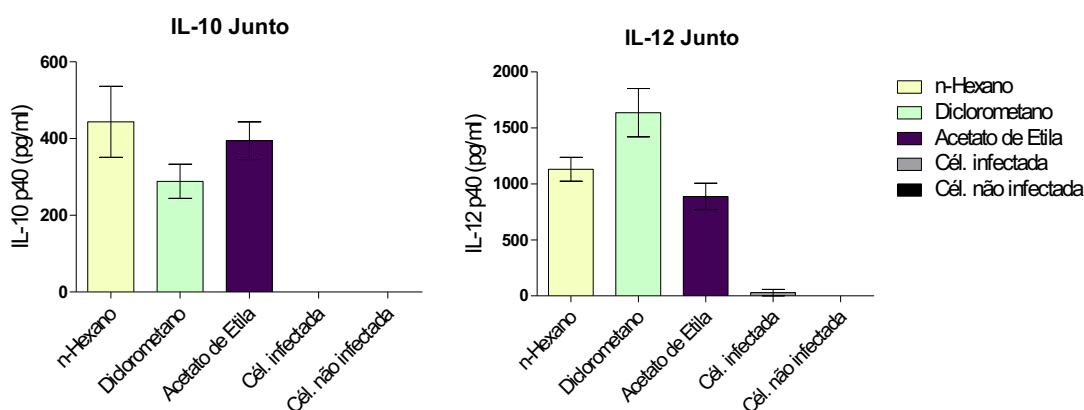


Figura 8 - Produção de citocinas IL-10 e IL-12 produzidas por macrófagos infectados pela cepa RH e tratados com frações de n-hexano, diclorometano e acetato de etila. Resultados estão expressos como Média $\pm$ DP.

5.9 Curva de mortalidade in vivo com pré-tratamento do taquizoita de *T. gondii* da cepa RH e ME49

Ao infectar os animais com parasitas pré-tratados por 1 hora com as frações n-hexano, diclorometano e acetato de etila de *Annona crassiflora* pode-se observar que ambas as cepas do parasita apresentaram perfil de resposta semelhante (Figura 9).

Com ambas as cepas os animais infectados com parasitas tratados por 1 hora com meio sobreviveram até o 8º dia da curva. A taxa de sobrevivência dos animais infectados com ambas as cepas tratadas com a fração de n-hexano foi abaixo de 60%.

Nos animais que receberam as cepas tratadas com a fração de acetato de etila observou-se de 50% de sobrevida nos animais infectados com a cepa RH e 70% para os animais infectados com a cepa ME49 ao fim dos 30 dias de infecção.

A maior taxa de sobrevivência foi encontrada nos grupos infectados com parasitas pré tratados com a fração de diclorometano, que foi próximo a 100% nos animais infectados com a cepa RH e 90% nos animais infectados com a cepa ME49.

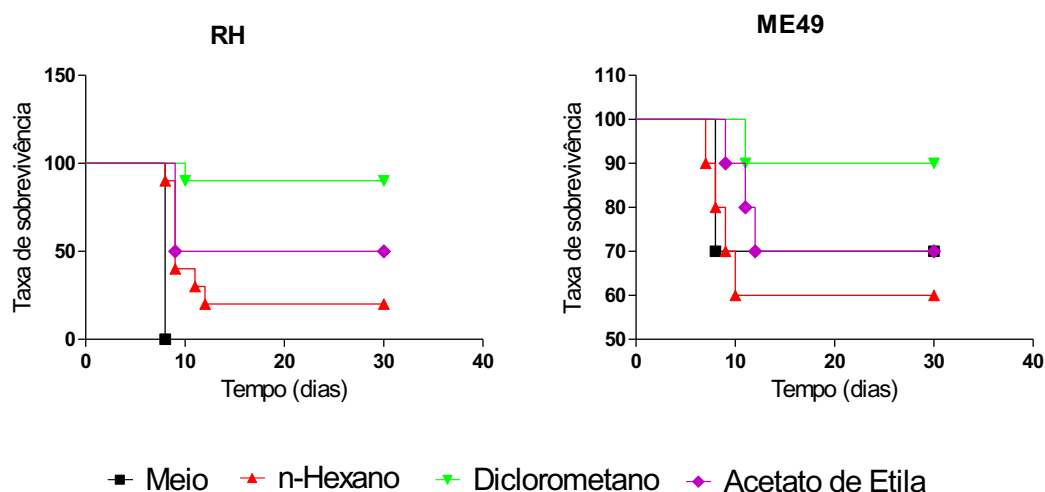


Figura 9 - Taxa de sobrevivência de animais infectados com parasitas das cepas RH (10^3 taquizoítos) e ME49 (10^5 taquizoítos) tratados com frações de n-hexano, diclorometano e acetato de etila após 30 dias.

5.10 Detecção de anticorpos anti-*T.gondii*

Após 30 dias de infecção os animais do experimento da curva de mortalidade que sobreviveram tiveram o sangue coletado e testado. Foi possível observar que os animais sobreviventes da cepa RH não apresentaram anticorpos IgG anti-*T.gondii* e os animais infectados com a cepa ME49 independente do tratamento soroconverteram (Figura 10).

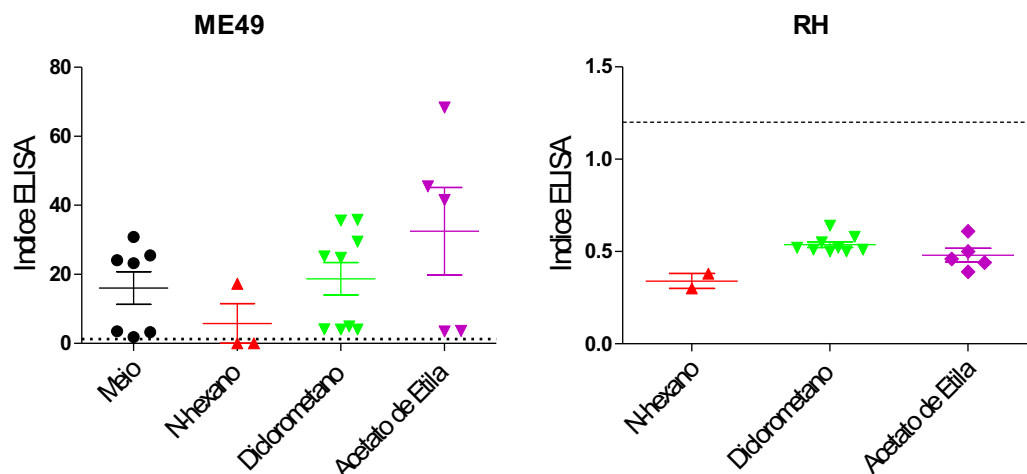


Figura 10 - Detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em animais sobreviventes da curva de mortalidade.

5.11 Pesquisa de cistos

A partir dos resultados encontrados na curva de sobrevivência citada no item 5.9, realizou-se a contagem de cistos presentes em macerado do cérebro dos animais sobreviventes que foram infectados pela cepa ME49 afim de confirmar e quantificar a infecção. Pode-se observar na figura 11 abaixo que o tratamento do parasita com as frações de n-hexano e diclorometano promoveram redução no número de cistos encontrado no cérebro dos animais comparados ao grupo controle em que o parasita foi tratado com meio.

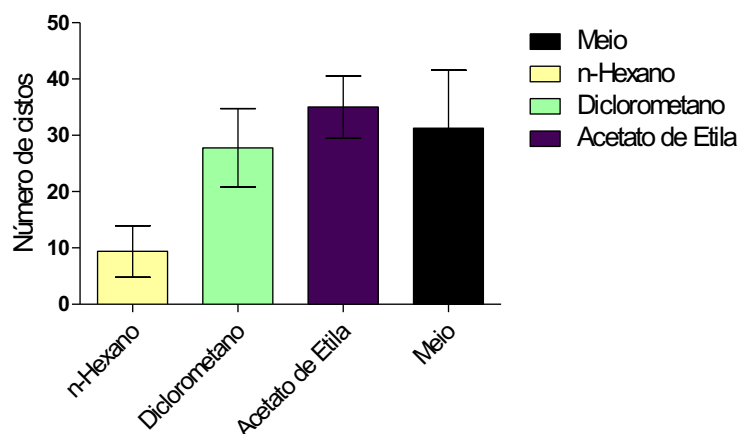


Figura 11 - Número de cistos encontrados no cérebro de animais infectados com parasitas da cepa ME49 tratados com frações de n-hexano, diclorometano e acetato de etila do extrato bruto de *Annona crassiflora*. Resultados estão expressos como Média $\pm$ DP.

6 DISCUSSÃO

A toxoplasmose é uma infecção causada por *T. gondii*, e embora um terço da população humana global esteja infectada por esse parasito, a maioria dos indivíduos são assintomáticos (OZGONUL; BESIRLI, 2017). A toxoplasmose é uma doença desafiadora em indivíduos imunocomprometidos e em casos de infecção congênita, causando complicações graves e podendo levar a óbito (LEESOMBUN et al., 2016). Diferentes aspectos relacionados à biologia do parasito e à resposta imune têm sido estudados, entretanto estudos focados em novas alternativas de tratamento estão defasados, por isso, torna-se essencial a busca por meios alternativos de tratamento para esta doença.

Atualmente os medicamentos de primeira escolha para o tratamento da toxoplasmose são a pirimetamina e a sulfadiazina. Entretanto são medicamentos com baixa eficácia e com efeitos adversos que não devem ser negligenciados. A utilização de plantas medicinais parece ser uma alternativa promissora nesse cenário, uma vez que diversas espécies de plantas têm sido utilizadas como medicamento pela humanidade, devido à riqueza de compostos que

apresentam, assim como pela sua abundancia, em especial na flora brasileira. *Annona crassiflora*, planta utilizada no presente estudo, é estudada por sua riqueza de compostos, estando entre eles os alcaloides, compostos fenólicos e as acetogeninas. Esses compostos identificados apresentam importante atividade antibacteriana, nematicida, antimalárica, antimutagênica, quimiopreventiva, anti-inflamatória, antiproliferativa em linhagens tumorais, anticolinesterásico, inseticida e larvicida (ARRUDA et al., 2018). Até o presente momento, poucos estudos relataram a sua ação antiparasitária em detalhes. Sabe-se que *A. crassiflora* parece ter ação leishmanicida e tripanosomicidas (MESQUITA et al., 2005). Dessa forma, o presente estudo visou avaliar a ação antitoxoplásmica do extrato e frações de *Annona crassiflora* Mart.

Diversos medicamentos naturais com efeito terapêutico comprovado podem ser prejudiciais ao organismo e por esse motivo é de extrema importância a avaliação da citotoxicidade dos compostos presentes nessas plantas antes de estudá-las como forma de medicamento natural. Por esse motivo, foi realizado o ensaio de MTT onde pôde-se observar que, dentre algumas das frações presentes nos extratos investigados, quando testadas em altas concentrações, como é o caso do extrato bruto e das frações de n-hexano e diclorometano na concentração de 1mg/ml, não foram capazes de manterem uma viabilidade celular aceitável. Resultados semelhantes foram observados em estudo com *Annona muricata*, planta da mesma família da utilizada no presente estudo. *A. muricata* foi estudada como agente antitoxoplásmico e mostrou boa viabilidade celular quando as células foram tratadas com concentração de 10 µg/ml do extrato e frações da planta (Miranda, N. C., 2018), o que corrobora com nosso estudo que identificou a concentração de 10 µg/ml como sendo a ideal.

Após determinar a concentração ideal a ser utilizada no trabalho (10 µg/ml) com base na citotoxicidade avaliamos a ação do extrato e frações de *Annona crassiflora* como agente antitoxoplásmico. A proliferação parasitária foi determinada utilizando-se o ensaio da β -

galactosidase. Foi utilizada a cepa RH 2F1 de *T. gondii* que apresenta a enzima β -galactosidase que cliva o substrato CPRG, promovendo uma reação colorimétrica que pode ser lida e quantificada de acordo com a intensidade de coloração. Observou-se que o extrato etanólico bruto, a fração de butanol e a fração aquosa não interferem na proliferação de *T. gondii* quando comparados ao grupo controle.

Miranda (2018) identificou um aumento no número de taquizoítas quando as células foram tratadas com as frações butanol e aquosa de *A. muricata* na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ e redução no número de taquizoítas quando o tratamento foi realizado com frações de diclorometano e n-hexano em relação ao controle (Miranda, N. C., 2018), corroborando com os resultados do presente estudo. A partir desses resultados, as frações n-hexano, diclorometano e acetato de etila foram selecionadas para dar continuidade aos demais experimentos, por serem as três frações que promoveram redução significativa da proliferação intracelular do parasita. A concentração inibitória foi avaliada para estabelecer a dose em que ocorre a inibição de 50% da taxa proliferativa do parasita. A concentração inibitória nas frações n-hexano, diclorometano e acetato de etila foram menores do que 35 μg .

Visando observar a influência dos extratos na viabilidade do parasito, foi realizado ensaios para detectar se as frações estavam lisando ou provocando a morte do parasito. Os taquizoítos foram tratados com as frações n-hexano, diclorometano e acetato de etila e avaliou-se a porcentagem de parasitos que incorporaram o azul de trypan ou iodeto de propídio. Em ambos experimentos observamos que nenhum dos tratamentos utilizados reduziu a viabilidade do parasito, indicando que a baixa proliferação parasitária observada no ensaio da β -galactosidase está relacionado a outro mecanismo, que não a morte celular.

Para elucidar o provável mecanismo envolvido na redução da proliferação parasitária, avaliou-se a exposição de fosfatidilserina na membrana celular do parasito. Verificamos que

as frações n-hexano, diclorometano e acetato de etila reduzem essa exposição. Células com morte programada expõe fosfatidilserina em sua membrana na intenção de ser reconhecida por fagócitos, promovendo uma fagocitose sem reação inflamatória, sendo essa uma forma de reparo tecidual sem danos ao organismo humano. *T. gondii* expõe FS, como forma de mimetismo de morte celular, e induz a produção de TGF- β pelos macrófagos (Seabra et al., 2004). Esse mecanismo de exposição de FS tem sido estudado como uma forma de evasão do parasito por macrófagos ativados (Seabra et al., 2004) e tem se revelado como ponto chave na entrada passiva do parasito na célula hospedeira levando ao sucesso da infecção (Wanderley & Barcinski, 2010). Tem sido demonstrado que parasitos que não expõe FS apresentam menor taxa proliferativa, o que provoca uma redução no índice de infecção e uma maior ativação da resposta imune (Santos et al., 2011). Em nosso estudo observamos que houve uma redução na exposição de fosfatidilserina pelos parasitas que passaram por tratamento com as frações de n-hexano, diclorometano e acetato de etila, o que pode ser relacionado com uma redução na taxa de proliferação.

A resposta imune é essencial para o controle da toxoplasmose, e o organismo dispõe de diversos mecanismos para combater uma infecção parasitária, dentre estes mecanismos está a produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio. Em contrapartida, é bem estabelecida a capacidade do parasita da cepa RH de inibir a resposta imune do hospedeiro (Melo, M.B. 2011). Levando-se em conta esses dados, avaliamos a produção de NO nas células infectadas e não infectadas por *T. gondii* tratadas com as frações de *Annona crassiflora*. Observamos que não houve produção de NO nas células não infectadas em nenhum dos tratamentos comparados ao controle (células infectadas), o que demonstra o efeito antioxidante da planta. Nas células infectadas e tratadas com as frações de *A. crassiflora* observamos um aumento significativo da produção de NO.

Para identificar o perfil de resposta imune gerada pela infecção na presença das frações de *A. crassiflora*, realizamos a dosagem de citocinas IL-10 e IL-12 em macrófagos peritoneais. A imunidade inata é a linha de defesa primária do hospedeiro contra uma infecção por patógenos. Os TLRs, reconhecem componentes denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Ao reconhecer os PAMPs são gerados sinais que levam a produção de citocinas como IL-12, estas estimulam as células natural Killer (NK) e as células T para produção de IFN- γ . Esta citocina constitui o principal mediador da resistência ao *T. gondii* e promove múltiplos mecanismos intracelulares para matar o parasita e inibir sua replicação (DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A. e HUNTER, C. A., 2012). Observamos, em nosso estudo, que quando os parasitas foram tratados com as três frações escolhidas houve uma maior produção de IL-12 do que produção de IL-10, comparada ao grupo controle, o que nos leva a concluir que o perfil de resposta imune seja do tipo Th1.

A IL-10 é um potente antagonista da capacidade dos macrófagos de eliminar bactérias e parasitas intracelulares. No entanto, em estudos em que camundongos KO para IL-10 foram infectados com *T. gondii* detectou-se aumento de danos hepáticos (DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A. e HUNTER, C. A., 2012), o que demonstra a importância da produção de IL-10 para evitar danos ao organismo, bem como a necessidade de haver um balanço entre a produção de IL-12 e IL-10. Em nosso estudo, observamos uma produção de IL-10 significativa, em relação ao controle. Podemos concluir com isso que o tratamento proposto promoveu um balanço entre a produção das duas citocinas, o que parece ser benéfico ao organismo, reduzindo a proliferação de taquizoítos e evitando-se consequências imunopatológicas graves.

Em síntese, foi possível observar que células não infectadas na presença das frações não produziram NO, IL-10 nem IL-12, em contraste com as células infectadas e tratadas, condições que provocaram aumentos significativos na produção de NO, IL-10 e IL-12,

comparando-se ao controle (células infectadas com cepa RH sem tratamento). Esses resultados demonstraram que as frações apresentam efeito predominante sobre o parasito e não sobre a célula hospedeira, uma vez que nenhum dos tratamentos aumentou a produção de NO ou IL-12 nas células não infectadas.

Há diversos estudos descritos na literatura, os quais têm relacionado fatores de virulência do parasito com a modulação da resposta imune, demonstrando a importância de proteínas presentes em *T. gondii*, como ROP18 e ROP5. Estes componentes parasitários são capazes de modular negativamente a resposta inflamatória, o que inclui a redução de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, favorecendo assim a proliferação de parasitos da cepa RH (Melo, M.B. 2011 e LEÓN M.M. 2019). Murillo-Leon e colaboradores (2019) descreveram um importante mecanismo relacionado à virulência da cepa RH e cepas recombinantes. Foi proposto que a alta virulência dessas cepas está associada às GTPases relacionadas à imunidade (IRG), e que o controle do parasita é feito via IFN- γ induzido por IRG.

Considerando os resultados obtidos, particularmente aqueles relacionados ao efeito das frações em reduzir a exposição de FS na membrana celular do parasito, o que pode estar atuando no controle da infecção por reduzir a proliferação parasitária, nós hipotetizamos que as frações estudadas podem estar atuando na modulação de IRG ou de algumas ROP, evitando, assim, que o parasita possa modular negativamente a resposta imune.

Após análise dos resultados obtidos *in vitro*, optamos por realizar os experimentos *in vivo*. Não encontramos trabalhos que mostrem infecção feita com parasitas tratados, no entanto, levando em conta nossos resultados anteriores e visando compreender a ação dessas frações, decidimos tratar por 1 hora os parasitas com as frações de n-hexano, diclorometano e acetato de etila para observar seus efeitos *in vivo*. Ao fim dos experimentos pode-se observar que mais de 90% do grupo que foi infectado com parasitas da cepa RH e ME49 tratados com a fração de diclorometano mantiveram-se vivos, diferente do grupo controle em

que o parasito foi tratado com meio. As demais frações apresentaram sobrevida menor ou igual a 50%. Isso nos confirma que a fração de diclorometano age de alguma forma sob o parasita evitando a sua invasão e proliferação no hospedeiro.

A soroconversão dos animais foi avaliada no dia 30. Surpreendentemente nenhum dos animais infectados com a cepa RH que sobreviveram apresentou sorologia positiva para *T. gondii* e todos os animais que sobreviveram da cepa ME49 foram positivos para IgG anti-*T. gondii*. Acreditamos que a diferença observada no resultado pode estar relacionada ao número de parasitas que utilizamos para infectar os animais e a concentração de fração usada, já que utilizamos a mesma dose para tratar 10^3 taquizoítos da cepa RH e 10^5 taquizoítos da cepa ME49. Assim, sugerimos que a concentração da fração utilizada no tratamento de 10^5 taquizoítos não tenha sido eficiente. Outra explicação plausível está relacionada às diferenças entre os dois parasitos. Sabemos que uma infecção bem-sucedida depende dos fatores de virulência de cada cepa e a modulação da resposta imune induzido por cada uma. Se as frações estiverem atuando sobre algum desses fatores poderia explicar a diferença observada entre cepas distintas.

O número de cistos dos animais infectados pela cepa ME49 tratada com as frações e com meio que sobreviveram até o 30º dia da curva foi avaliado e pôde-se observar que houve um menor número de cistos nos animais do grupo de n-hexano e diclorometano, comparado ao grupo controle, o que sugere que a infecção pode ter sido controlada parcialmente, mas não tendo sido eficiente para evitar que o parasita se estabelecesse no hospedeiro. Os resultados obtidos *in vivo* corroboraram com o observado *in vitro*, sendo a fração Diclorometano foi considerada a mais eficiente no controle da infecção por *T. gondii*. Os animais infectados com RH não soroconverteram e embora tenhamos observado a presença de cistos nos animais infectados com ME49 tratados com o Diclorometano, é visível o

aumento da sobrevivência dos animais, o que pode ser resultado de um controle mais rápido da infecção em relação aos outros grupos.

Considerando-se o conjunto dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que a *Annona crassiflora* Mart. tem potencial como agente antitoxoplásmico, e destacamos o potencial da fração Diclorometano. No entanto, são necessários estudos adicionais para desvendar os mecanismos envolvidos quando se utiliza esta fração de *Annona crassiflora* Mart. no controle da infecção por *T. gondii*.

7 CONCLUSÃO

Ao fim do trabalho pode-se concluir que as frações do extrato etanólico bruto de *Annona crassiflora* Mart. agem sob o *Toxoplasma gondii*, diminuindo sua proliferação por um mecanismo ainda não elucidado completamente mas mantendo o parasita vivo.

Dentre as frações utilizadas, obtivemos melhor resultado *in vitro* e *in vivo* com a fração de Diclorometano, o que nos leva a hipotetizar que a fração apresenta algum componente que influencia na replicação do parasita, resultando na indução de resposta imune capaz de ser mais efetiva na defesa do organismo.

Estudos adicionais são necessários para identificação do componente molecular presente na fração diclorometano de *Annona crassiflora* Mart. que é responsável por essa ação antitoxoplásmica.

8 REFERÊNCIAS

- ALDAY, P. H.; DOGETT, J. S. Drugs development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 273-293, 2017.
- ARRUDA, H. F. et al. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v.254, p.740, 2018.
- BABAIE, J. et al. Immunization of C57BL/6 mice with GRA2 combined with MPL conferred partial immune protection against *Toxoplasma gondii*. **Iranian Biomedical Journal**, v. 22, n. 1, p. 22-32, 2017.
- BAILÃO, E. F. L. C. et al. Bioactive compounds found in Brazilian Cerrado fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, p.23762, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Uso de plantas medicinais e fitoterápicos sobe 161%. 2016. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-efitoterapicos-sobe-161>. Acesso em: 27 mar. 2017.
- DUPONT, C.D.; CHRISTIAN, D. A. e HUNTER, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Seminars in Immunopathology**, v. 36 p. 793–813, 2012.
- FLEGR, J. et al. Toxoplasmosis – A Global Threat. Correlation of latente Toxoplasmosis with Specific disease burden in a set of 88 countries. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, e90203, 2014.
- JUSTINO, A. B. et al. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidasde and glycation inhibitory activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 69 p. 168, 2016.

LEESOMBUN, A.; BOONMASAWAI, S.; SHIMODA, N.; NISHIKAWA, Y. Effects of extracts from Thai Piperaceae plants against infection with *Toxoplasma gondii*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, e0156116, 2016.

LEÓN, M. M. Molecular mechanism for the control of virulent *Toxoplasma gondii* infections in wild-derived mice. **Nature Communications**, v. 10, p. 1-15, 2019.

MELO, M. B., JENSEN, K. D., & SAEIJ, J. P. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends in Parasitology**, v. 27(11), p.487-495, 2011.

MESQUITA, M. L. et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p. 784, 2005.

MIRANDA, N. C. Efeito do Extrato Bruto Etanólico da Planta *Annona Muricata L.* (Graviola) e suas Frações no controle da infecção *in vitro* e *in vivo* por *Toxoplasma Gondii*. **Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada**, 2018.

MONTAZERI, M., SHARIF, M.; SARVI, S.; MEHRZADI, S.; AHMADPOUR, E.; DARYANI, A. A systematic review of in vitro and in vivo activities of anti-Toxoplasma drugs na compounds (2006-2016). **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 25, p. 1-31, 2017.

NASR, I. A. et al. Toxoplasmosis and anti-Toxoplasma effects of medicinal plant extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.730, p.731, 2016.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDE, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11^a ed. São Paulo, 2005.

OZGONUL, C.; BESIRLI, C. G. Recent developments in the diagnosis and treatment of ocular toxoplasmosis. **Ophthalmic Research**, v. 57, p. 1-12, 2017.

REIS, M. P. et al. Molecular docking to *Toxoplasma gondii* thymidylate synthase-dihydrofolate reductase and efficacy of raltitrexed in infected mice. **Parasitology Research**, v. 117, p. 1465-1471, 2018.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, France, v. 25, n. 2, p. 264–296, 2012.

RODRIGUES, A. G.; AMARAL, A. C. F. Aspectos sobre o desenvolvimento da fitoterapia. In: BRASIL. **Práticas Integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Ministério da Saúde, 2012.

SANTANA, S. S. Análise cinética da resposta imune humoral contra a proteína recombinante SAG2A em pacientes com toxoplasmose aguda. **Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**. Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

SASAI M.; PRADIPTA A.; YAMAMOTO M. Host immune responses to toxoplasma gondii. **International Immunology**. v. 30, p. 113-119, 2018.

SEABRA SH, DE SOUZA W, DAMATTA RA. Toxoplasma gondii exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 324, p. 744-52, 2004.

SENA, I. V. Papel das espécies reativas de oxigênio na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. **Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas**. Natal, 2015

SEPÚLVEDA-ARIAS, J. C.; VELOZA, L. A.; MANTILLA-MURIEL, L. E. Anti-Toxoplasma Activity of Natural Products: A review. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, Colombia, v. 9, n. 3, p. 186-194, 2014.

SHARIF, M. et al. The efficacy of herbal medicines against *Toxoplasma gondii* during the last three decades: a systematic review. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 94, p 1237-1248, 2016.

VILAR, JB.; FERRI, PH.; CHEN-CHEN, L. Genotoxicity investigation of araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS- Inductest and Ames test. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, p.2, 2011.

WANDERLEY JL, BARCINSKI MA. Division of Experimental Medicine, **National Cancer Institute**, 2010. Apoptosis and apoptotic mimicry: the Leishmania connection. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2010.

ANEXO I

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Investigação de protocolos vacinais contra infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ruminantes de importância zootécnica", protocolo nº 109/16, sob a responsabilidade de **Tiago Wilson Patriarca Mineo** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **30 de setembro de 2016**.

(We certify that the project entitled "Investigação de protocolos vacinais contra infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em ruminantes de importância zootécnica", protocol 109/16, under the responsibility of Tiago Wilson Patriarca Mineo - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of September 30th, 2016).

Vigência do Projeto	Início: 01/12/2016 Término: 31/12/2020
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo isogênico e camundongo <i>Knockout</i>
Número de animais	4572
Peso / Idade	20 g / 6-8
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	Centro de Biotério e Experimentação Animal CBEA - UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 24 de novembro de 2016.

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