

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE  
FLUMINENSE CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

**EXTRATO DE ALGA MARINHA DE *Dictyota caribae* RICO EM  
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS REDUZ CRESCIMENTO DE *Toxoplasma  
gondii In vitro***

YAGO MOREIRA RODRIGUES

Campos dos Goytacazes - RJ

Setembro – 2019

**EXTRATO DE ALGA MARINHA DE *DICTYOTA CARIBEA* RICO EM  
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS REDUZ CRESCIMENTO DE  
*TOXOPLASMA GONDII IN VITRO***

YAGO MOREIRA RODRIGUES

Trabalho de defesa de dissertação de mestrado, apresentado por Yago Moreira Rodrigues ao Centro de Biociências e Biotecnologia da UENF como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Biociência e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Sérgio Henrique Seabra.

Orientador: SÉRGIO ENRIQUE SEABRA

Coorientador: RENATO AUGUSTO DAMATTA

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

Setembro - 2019

**EXTRATO DE ALGA MARINHA DE *DICTYOTA CARIBEA* RICO EM  
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS REDUZ CRESCIMENTO DE  
*TOXOPLASMA GONDII IN VITRO***

**YAGO MOREIRA RODRIGUES**

Trabalho de defesa de dissertação de mestrado, apresentado por Yago Moreira Rodrigues ao Centro de Biociências e Biotecnologia da UENF como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Biociência e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Sérgio Henrique Seabra.

Examinada em 27 de setembro de 2019:

---

Prof. Dr. Fábio da Silva de Azevedo Fortes (Examinador)

---

Prof. Dr. Milton Masahiro Kanashiro (Examinador)

---

Prof. Dr. Clóvis de Paula Santos (Examinador)

---

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta (Coorientador)

---

Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra (Orientador)

O segredo da vida  
não é ter tudo que  
você quer, mas amar  
tudo que você tem!!

George Carlin

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me ouvir nos momentos em que chamei e pedi em silêncio, me dando o necessário para continuar em frente mediante vitórias ou derrotas.

Agradeço a minha família especialmente aos meus pais Maria Aparecida e Renato Ferreira Rodrigues, aos meus avós Adelina Vitalina e Antônio Moreira que em nenhum momento me deixaram pensar que eu estava só contra o mundo mediante todas as circunstâncias pelas quais só eles e Deus sabem que eu passei.

Agradeço a minha namorada e incrível amiga Juliana Machado, que me apoiou e me incentivou como se minha luta também fosse dela, que ficou ao meu lado nos momentos em que tudo parecia ruir aos poucos, por ter acreditado em mim, e não ter me deixado desistir nas horas em que achei que não poderia continuar mais.

Agradeço a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, ao meu orientador Sérgio Henrique Seabra e toda sua equipe, ao meu professor e coorientador Renato Augusto DaMatta por todo auxílio e conhecimento passado, agradeço também a todo o seu grupo pela ajuda e auxílio nos momentos de dificuldade. À meu grande amigo Pedro Souto Rodrigues, pela grande ajuda durante todo o meu mestrado, ao meu amigo Thiago Alvez que junto comigo, deu o ponta pé inicial para que esse trabalho acontecesse, à Thiago Torres e Natália Azevedo, pelo auxílio nos testes de viabilidade e interação. Ao professor Ângelo Burla, pelo auxílio nos testes de osmolaridade, e ao professor Leonardo Paes Cinelli, sem o qual não seria possível a elaboração deste trabalho. Por último, agradeço às agências de fomento, FAPERJ, CNPq e Capes.

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é o agente da toxoplasmose, doença de grande relevância médica e veterinária. Essa doença é tratada com a associação de sulfadiazina com outros fármacos. Porém esse tratamento apresenta diversos efeitos colaterais. Devido a isso, existe necessidade de desenvolver medicamentos menos agressivos ao hospedeiro da doença. Algas marinhas são importantes fontes naturais de polissacarídeos sulfatados. Os polissacarídeos sulfatados apresentam capacidade anticoagulante, anticancerígena e antifúngica. Devido a estas características e a presença do grupamento sulfa na estrutura da molécula que constitui o polissacarídeo, a fração alcoólica F9 do extrato bruto da alga marinha *Dictyota caribea* foi testada *in vitro*. Para tal utilizamos como modelo experimental células da linhagem LLC-MK2 (células epiteliais do rim do macaco Rhesus) infectadas com *T. gondii*, cepa RH, na sua forma de taquizoíto, presente na fase aguda da infecção. Células LLC-MK2 tratadas com a fração F9 não perderam viabilidade e apresentaram menor crescimento de *T. gondii* em relação ao controle. Alterações morfológicas foram observadas pela microscopia óptica. Porém as células tratadas com a fração F9 não apresentaram marcação pela lectina DBA indicando que o tratamento não induziu conversão da forma taquizoíto em bradzoíto. LC3 também não foi detectada nos parasitos de células hospedeiras tratadas com a fração F9 indicando que a redução do crescimento não está relacionada a morte celular por autofagia. Mais análises são necessárias para determinar a forma de ação da fração F9. Frações de algas marinhas ricas em polissacarídeos sulfatados podem ser fonte interessante para tratamento experimental da toxoplasmose.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; *Dictyota caribea*; Polissacarídeos sulfatados.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is the agent of toxoplasmosis, a disease of medical and veterinary relevance. This disease is treated with the combination of sulfadiazine with other drugs. However, this treatment has several side effects. Because of this, there is a need to develop less aggressive drugs to the host harboring the disease. Seaweed is an important natural source of sulfated polysaccharides. Sulfated polysaccharides have important health functions, with antifungal, anticoagulant and anticancer characteristics. Due to these characteristics and the presence of sulfa group in the structure of the polysaccharide molecule, the alcoholic fraction F9 obtained from the raw seaweed extract *Dyctiota caribea* was tested *in vitro* using LLC-MK2 cell lineage (kidney epithelial cells from Rhesus monkey) infected with *T. gondii*, strain RH, in its tachyzoite form, present in the acute phase of infection. LLC-MK2 cells treated with F9 fraction did not lose viability and showed lower growth of *T. gondii* compared to control. Morphological changes were observed by optical microscopy. However, cells treated with the F9 fraction did not show labeling for DBA lectin indicating that the treatment did not induce conversion of the tachyzoite form to the bradzoite. LC3 was also not detected in parasites of host cells treated with the F9 fraction indicating that growth reduction was not related to autophagy cell death. Further analysis is needed to determine the mode of action of F9 fraction. Seaweed fractions rich in sulfated polysaccharides may be an interesting source for experimental treatment of toxoplasmosis.

Key words: *Toxoplasma gondii*; *Dictyota caribea*; Sulphated polysaccharides

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	12
2.1. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	13
2.2. Ciclo de vida.....	14
2.3. Divisão celular.....	15
2.4. Mecanismo de invasão .....	17
2.5. Diagnóstico .....	17
2.6. Quimioterapia.....	17
2.7. Algas marinhas, fonte de Polissacarídeos sulfatados .....	20
3. OBJETIVO.....	21
4. METODOLOGIA .....	21
4.1. Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	21
4.2. Cultura de LLC-MK2.....	21
4.3. Obtenção de frações etanólicas do extrato de <i>Dictyota caribae</i> .....	22
4.4. Osmolaridade da fração F9.....	23
4.5. Viabilidade Celular.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.6. Microscopia óptica .....	23
4.7. Morte celular por autofagia. ....	24
4.8. Conversão de taquizoíto em bradzoíto (Lectina DBA). ....	25
5. RESULTADOS .....	26
6. DISCUSSÃO.....	33
7. CONCLUSÃO .....	37
8. PERSPECTIVAS .....	38
9. REFERÊNCIAS .....	39



## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1- Forma taquizoíta de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	14
Fig. 2- Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	15
Fig. 3- Esquema de divisão por endodiogenia de <i>Toxoplasma gondii</i> em sua forma taquizoíta. ....	16
Fig. 4. Fórmula molecular da Pirimetamina. ....	18
Fig. 5. Fórmula molecular da sulfadiazina. ....	19
Fig. 6. Índice de infecção de <i>Toxoplasma gondii</i> . ....	26
Fig. 7. Viabilidade Celular .....	27
Fig. 8. Índice de inibição do crescimento de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	28
Fig. 9. Imagens de campo claro de células LLC-MK2 infectadas com <i>Toxoplasma gondii</i> .....	29
Fig. 10. Avaliação de cistogênese por marcação com lectina DBA. ....	30
Fig. 11. Avaliação de morte por autofagia por marcação de LC3 em análise de imunofluorescência.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

- DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- GRA- Grânulos densos
- HIV- Vírus da imunodeficiência humana.
- LC3- Light chain 3
- LDH- Lactato desidrogenase
- LLC-MK2- *Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells*
- MIC- Micronêmas
- MTT- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolim bromidefor
- PBS- Tampão fosfato salino
- PCR- Reação em Cadeia da Polimerase
- RON- *Rhoptry Neck Proteins*
- ROP- *Rhoptry Bulbos Proteins*
- SFB- Soro fetal bovino

# 1. Introdução

A Toxoplasmose é uma Zoonose causada pelo *Toxoplasma gondii*, protozoário intracelular obrigatório (AMENDOEIRA e COURA, 2010), que infecta milhões de pessoas ao redor do mundo. A prevalência de infecção humana na maioria dos países fica entre 20% e 50%, essa taxa varia no Brasil podendo apresentar índices entre 60% e 80%, variando entre as áreas estudadas (CRISTO *et al.*, 2005). Embora a infecção por *T. gondii* seja geralmente assintomática nos indivíduos imunologicamente competentes, costuma apresentar quadros clínicos graves em indivíduos que apresentam quadros de imunodeficiência (transplantados, submetidos a quimioterápicos, portadores de HIV e outras doenças), podendo levar o hospedeiro á óbito (AMENDOEIRA & COURA, 2010). A taxa de transmissão materno-fetal varia entre 30% a 40%, havendo relação inversa entre a idade gestacional em que ocorre a primo-infecção e a severidade da doença. Apesar de no primeiro trimestre de gestação esta taxa de transmissão da mãe para o feto ser menor (15%), a doença é mais grave, pode ocorrer aborto espontâneo nesse período, morte fetal, morte perinatal e graves sequelas neurológicas (MARTINS, 2002).

O tratamento da toxoplasmose pode ser empregado tanto em humanos quanto em animais e, a utilização dos medicamentos específicos utilizados de maneira correta, evita a progressão da doença no organismo. A necessidade, o tempo, e a forma de tratamento são determinados levando em consideração o estado imune do hospedeiro e o progresso da doença no organismo (SPÓSITO e OLIVEIRA, 2009).

Os principais métodos de tratamento empregados no quadro agudo da doença atualmente são os medicamentos sulfamídicos e, em destaque, a sulfadiazina. É empregado sulfametoxazol e a associação de sulfadoxina à pirimetamina. A combinação destes dois últimos medicamentos pode gerar efeitos colaterais no paciente, como por exemplo, supressão da medula óssea e anemia megaloblástica. Por esta razão, o emprego do ácido folínico é prescrito concomitantemente como medida preventiva de distúrbios hematológicos (NETO, 1982). O tratamento de toxoplasmose congênita deve ser feito com terapêutica específica em todos os recém-nascidos, quer seja na sua forma sintomática ou subclínica, sendo no último caso utilizada com a finalidade de prevenir as sequelas tardias que possam vir a ocorrer (DINIZ e VAZ, 2003).

Polissacarídeos sulfatados são estruturas que vem sendo estudadas com principal intuito de substituírem a heparina como anticoagulantes. Determinou-se que polissacarídeos sulfatados de algas marinhas são promissores para tal finalidade. As algas marinhas são organismos filogeneticamente distantes dos mamíferos. Portanto, o risco por contaminação viral é mínimo. As algas podem ser divididas em três grandes grupos: verdes, marrons e vermelhas. As espécies desses grupos apresentam polissacarídeos sulfatados em sua composição (ROCHA *et al.*, 2004). Os extraídos de algas pertencentes ao grupo das algas vermelhas demonstraram na literatura serem superiores a heparina como anticoagulantes, provando a eficácia desses extratos para tal finalidade (RODRIGUES *et al.*, 2009). Ademais, polissacarídeos sulfatados extraídos da alga *Champia feldmannii* (CF-PLS) foi utilizado para avaliação do seu potencial antitumoral e imune estimulante. CF-PLS não apresentou citotoxicidade *in vitro*, e foi capaz de reduzir o tumor Sarcoma 180 implantado em camundongos em 48% em doses de 10 e 25 mg/kg (LINS, 2008).

Os polissacarídeos sulfatados são macromoléculas complexas e heterogêneas que possuem na sua composição o radical sulfato (SOUZA *et al.*, 2007). Especula-se que esse radical é “responsável” pela ação e eficácia da sulfadiazina no tratamento contra *T. gondii* tendo conhecimento de que no tratamento com sulfadiazina, tem-se conhecimento de que o grupamento sulfa é responsável pela competição pelo ácido paraminobenzóico contra o parasito, interferindo em processos metabólicos de grande importância para a replicação do mesmo. (DE SOUZA *et al.*, 2004).

A Toxoplasmose é uma doença de prevalência mundial. Por ser negligenciada, há pouco interesse na produção de novos fármacos para o seu tratamento. A maioria dos fármacos empregados no tratamento da doença, como já dito anteriormente, apresentam uma série de efeitos adversos não desejáveis ao hospedeiro. Nossos estudos visaram uma forma menos prejudicial para o tratamento dessa doença. Foi avaliada a eficácia da fração F9 do extrato de alga marinha *Dictyota caribae* como anti-*T. gondii*.

# 1. Revisão de literatura

A toxoplasmose é uma infecção zoonótica altamente prevalente a nível mundial, é transmitida pelos oocistos liberados nas fezes, contaminando assim a água e o solo, a infecção pode se dar também por cistos teciduais possam estar presentes em carne infectada crua ou malcozida. Oocistos e cistos teciduais são formas de transmissão de *T. gondii* (MEIRLES *et al.*, 2015) agente causador desta doença. A primo-infecção durante a gestação pode causar sequelas que ameaçam a saúde do feto, ou que podem até mesmo levar a morte do mesmo no útero (GOLKAR, 2012). Esta doença, na maioria dos casos, só atingirá um estado grave caso o hospedeiro tenha algum tipo de imunocomprometimento, aqueles que não possuem também são passíveis de serem afetados pela doença, porém nestes casos o parasito irá permanecer no organismo do indivíduo na forma crônica da doença, não apresentado sintomas na maioria dos casos. (WONG e REMINGTON, 1994).

A infecção por toxoplasmose durante a gestação pode dar início a um quadro de infecção congênita podendo manifestar-se como retardo mental e cegueira no neonato, isso irá depender da gravidade e do período em que ocorre. Nesse tipo de caso, recomenda-se para o tratamento das gestantes o emprego de espiramicina e sulfonamida para infecção presumida, a fim de minimizar a transmissão da mãe para o neonato, e tentar também reduzir os riscos causados pela infecção (WALLON *et al.*, 1999).

*Toxoplasma gondii* tem a capacidade de se multiplicar na maioria das células nucleadas e possui tropismo pelos tecidos do sistema nervoso central e retina (FERGUSON, 2009). A toxoplasmose ocular é uma retinite necrosante com alto potencial de causar cegueira. A perda permanente de visão pode ocorrer se as lesões afetarem a mácula ou a cabeça do nervo óptico. Outras complicações podem vir a surgir na região ocular, o que incluem opacidades vítreas persistentes, membranas epirretinianas (camada de tecido muito fina que se desenvolve sobre a superfície da região central da retina) e edema macular cistoide (doença ocular que ocorre na parte da retina denominada mácula) (AZEVEDO *et al.*, 2015).

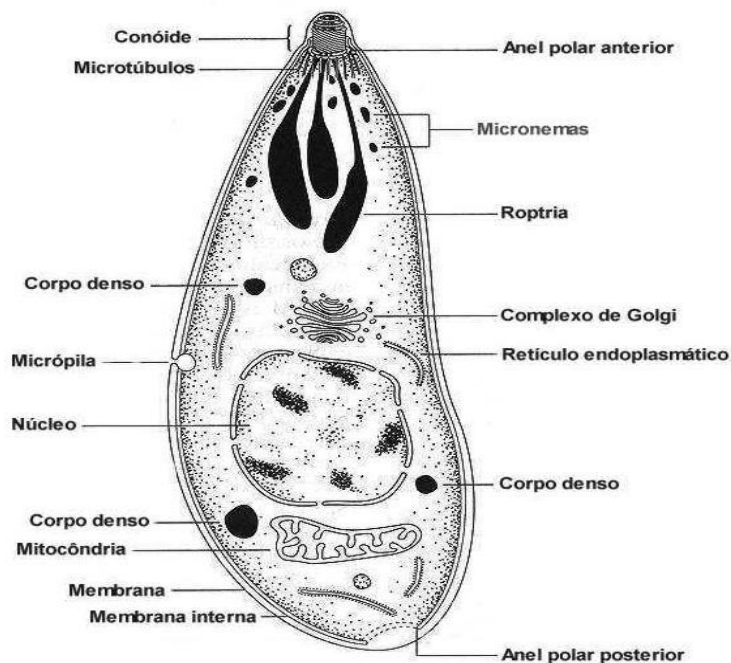
Em cães a toxoplasmose é uma das maiores causas de doenças neurológicas relacionadas a infecção por protozoários, embora esse tipo de doença não seja muito comum (CARVALHO *et al.*, 2015). No homem, quando o sistema nervoso central é acometido, pode-se detectar cefaleia, sonolência e mudança de comportamento, com

duração variável de dias ou semanas, seguido por coma, convulsões, síndromes piramidais o cerebelar, paralisias oculares e transtornos psíquicos (SILVA *et al.*, 2001).

### **1.1. *Toxoplasma gondii***

*Toxoplasma gondii* foi primeiramente descrito no Brasil por Splendore em 1908 no coelho, e no norte da África por Nicolle e Manceaux em um roedor. O primeiro caso de toxoplasmose congênita no ser humano só foi relatado em 1937 por Wolf e Cowen (LYONS & JOHNSON, 1995). Tem como hospedeiro definitivo os felídeos, colocando desta forma os gatos domésticos como maior meio de transmissão da doença para o homem (GARCIA *et al.*, 1999). Este parasito é pertencente ao reino *Protista*, família *Sarcocystidae*, e subfamília *Toxoplasmatinae* (FRENKEL *et al.*, 1976). Estruturalmente formado por anéis polares, conóide, microtúbulos, grânulos densos, micronemas, róptrias, mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, ribossomos, microporo e o núcleo (SOUZA *et al.*, 2010, METSIS e PETERSEN, 1995).

Esse parasito não possui nenhum tipo visível de estrutura que auxilie sua locomoção. É constituído morfologicamente por estruturas que auxiliam o seu processo de invasão e posteriormente, sobrevivência, uma vez dentro de células hospedeiras sendo essas estruturas chamadas de conóide, róptrias e micronema (Fig. 1). O conóide pode efetuar movimentos como girar, se inclinar, se estender e retrair, reconhecendo a membrana externa da célula hospedeira para que possa então começar o processo de invasão. É também capaz de secretar proteínas associadas ao processo de invasão celular e regulação da resposta imunológica do hospedeiro, tais proteínas são as de micronemas (MIC), grânulos densos (GRA) e róptrias (ROP e RON) (DUBEY *et al.*, 1998).



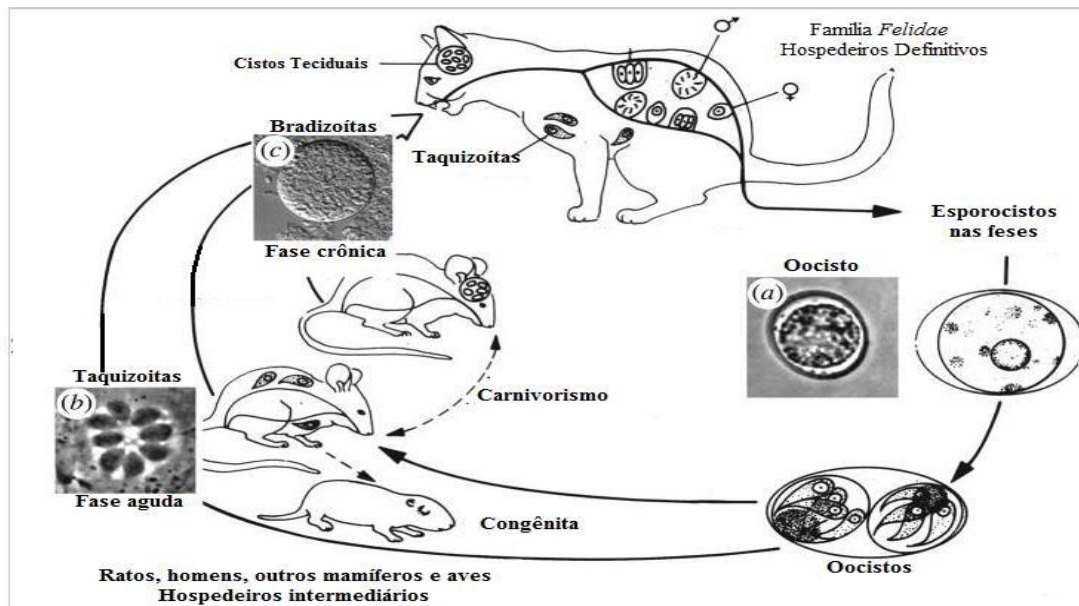
**Fig. 1- Forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*.** Da parte anterior para posterior temos as seguintes estruturas e organelas: Conóide, anel polar anterior, microtúbulos, micronemas, róptria, corpo denso, sistema de Golgi, retículo endoplasmático, núcleo, mitocôndria, membrana, membrana interna e anel polar anterior. Adaptado de Macre (2002).

## 1.2 Ciclo de vida

O ciclo de vida de *T. gondii* (Fig. 2) é complexo. Esse parasito multiplica-se se sexualmente e assexualmente (BOOTHROYD *et al.*, 2002). O ciclo sexuado ocorre apenas no epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos (espécies da família *Felidae* ), culminando na gametogênese; com a fertilização, origina-se oocistos não esporulados (zigoto diploide) que são liberados nas fezes e esporulam no meio ambiente resultando na formação de esporozoítos no seu interior. A infecção pelos oocistos geralmente se dá através da ingestão de água ou vegetais contaminados (WONG & REMINGTON, 1993; DUBEY *et al.*, 1998). Outra forma de se contrair a doença é pela ingestão de cistos teciduais viáveis presentes em carnes mal cozidas ou cruas. Após a ingestão, os cistos ou oocistos terão sua parede degradada pelas enzimas presentes no trato digestivo liberando as formas esporozoíta (oocisto) ou bradizoíta (cisto tecidual) no organismo do indivíduo que agora passa a ser o hospedeiro do parasito. Essas duas formas invadem o epitélio intestinal, e chegam à lâmina própria intestinal onde se multiplicam e se diferenciam para sua forma mais

rápida de proliferação, denominada de taquizoíto (SOUZA *et al.*, 2010).

Essas formas se multiplicam no interior da maioria das células nucleadas, levando ao rompimento da mesma, liberando assim um grande número de taquizoítos que eventualmente chegarão à corrente sanguínea e linfática, possibilitando a infecção de células em tecidos distantes. Esse momento do ciclo é conhecido por caracterizar a fase aguda da doença. Porém o sistema imune atua contra a infecção por *T. gondii*, controlando assim o crescimento exacerbado do parasito pelo organismo. Nesse processo, para garantir sua sobrevivência no hospedeiro, o parasito se diferencia de taquizoíto para bradizoíto, forma esta, que irá se multiplicar mais lentamente culminando na formação dos cistos teciduais. Esta fase irá caracterizar o estado crônico da doença (SIBLEY, 2009). Nos enterócitos do intestino dos felídeos os bradizoítos se diferenciam por esquizogonia, e eventualmente formam gametas femininos e masculinos, que como já foi descrito acima, irão se fundir no interior do epitélio intestinal originando assim o zigoto diploide (DUBEY *et al.*, 1998).



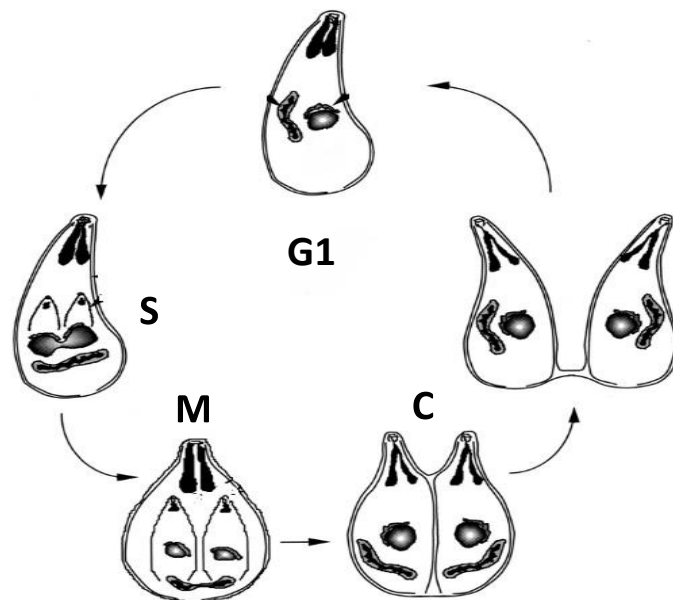
**Fig. 2- Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.** A fase sexuada ocorre apenas no intestino dos membros da família *Felidae* (hospedeiros definitivos). (a) Oocistos diploides esporulam no meio ambiente, originando esporozoítos. (b) Taquizoítos dividem-se rapidamente por endodiogenia e podem ser transmitidos congênitamente. (c) Na fase crônica, cistos teciduais contendo bradizoítos são formados em tecidos do hospedeiro. Tais cistos são disseminados por via oral para diversos hospedeiros. Adaptado de SIBLEY *et al.* (2010).

### 1.3 Divisão celular

A forma de replicação assexuada é conhecida como endodiogenia e consiste no



processo em que duas células filhas são originadas no interior de uma célula mãe, que irá sofrer lise ao final do processo liberando duas novas células formadas (fig. 3). Essa divisão ocorre apenas nas formas taquizoíta e bradizoíta de *T. gondii*. O ciclo celular durante a endodiogenia possui quatro fases distintas, descritas como fase G1, fase S, fase M e fase C. Na fase G1 ocorre a replicação do complexo de *Golgi*, seguida da translocação do centróssomo, da parte anterior para a posterior do núcleo. Na fase S ocorre a duplicação do centróssomo, o que coincide com o início da replicação do material genético. Na fase M ocorre a formação de dois novos complexos apicais rudimentares, que irão nuclear os microtúbulos subpeculiares e o complexo interno de membrana, o que irá então definir as duas células filhas no interior da célula mãe. Na fase C, os núcleos terminam seu processo de replicação e as células filhas se estendem, consumindo assim a célula progenitora originando assim duas novas células (GAJI *et al.*, 2010).



**Fig. 3- Esquema de divisão por endodiogenia de *Toxoplasma gondii* em sua forma taquizoíta.** Fase G1: processo de replicação do complexo de Golgi; S: duplicação do centróssomo e finalização de processo de replicação; M: formação de dois novos complexos apicais e nucleação de microtúbulos e complexo interno de membranas; C: finalização do processo de replicação originando duas células filhas. Adaptado de BLACK & BOOTHROYD (2000).

#### **1.4 Mecanismo de invasão**

*Toxoplasma gondii* pode invadir células hospedeiras nucleadas de duas maneiras: fagocitose (JOINER e DUBREMETZ, 1993) na qual o parasito não tem participação ativa no processo de invasão; ou por penetração ativa, na qual o parasito entra em contato com a membrana plasmática da célula hospedeira, força-a, e forma um vacúolo em torno do seu corpo (vacúolo parasitofóro) durante o processo de invasão. Durante essa etapa, algumas organelas secretoras do parasito liberam seus conteúdos específicos (MIC 2 no caso das micronemas) que irá iniciar o processo de mobilidade do parasito para o interior da célula hospedeira (BROSSIER *et al.*, 2003). Essa mobilidade se dá através da adolase, enzima ligada à via glicolítica, que dispara polimerização local de actina, atuando na ligação entre a MIC 2 e o citoesqueleto do parasito, gerando assim mobilidade necessária para que o processo de invasão seja efetuado (SIBLEY, 2003).

Para que o processo seja efetivo, a membrana da célula hospedeira invagina-se no ponto de contato com o parasito, esse processo origina uma estrutura chamada junção móvel, que é formado por proteínas provenientes das Róptrias chamadas de RONS, proteínas provenientes dos micronemas (AMA 1) e por conteúdo da células hospedeira (SANTOS *et al.*, 2009).

#### **1.5 Diagnóstico**

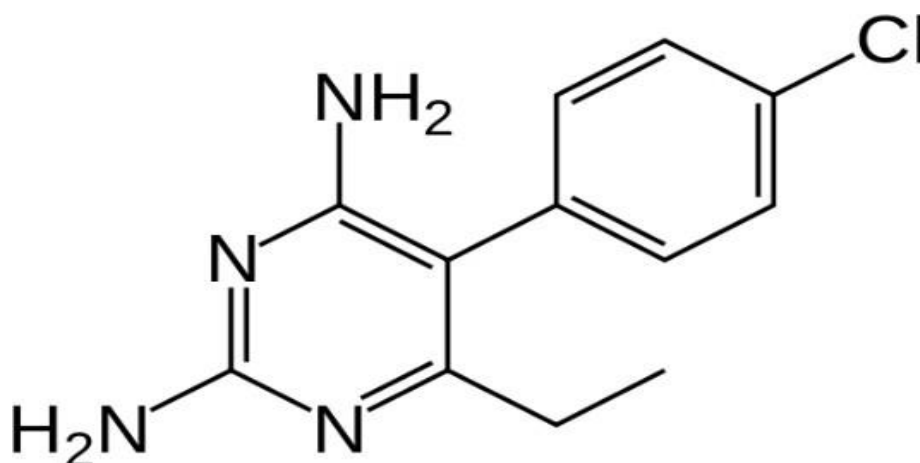
Os métodos laboratoriais mais empregados atualmente para o diagnóstico de toxoplasmose incluem o exame da espécie patogena e os testes imunológicos. Embora este último tenha suas limitações, é ainda o mais utilizado nos laboratórios de análises clínicas. Na melhoria do diagnóstico da toxoplasmose congênita e em pacientes com AIDS, tem-se empregado, alternativamente, a reação em cadeia de polimerase (PCR) e Nested-PCR (CANTOS *et al.*, 2000).

#### **1.6 Quimioterapia**

Grande parte dos quimioterápicos utilizados no tratamento da toxoplasmose, possuem efeito antifolato. Medicamentos deste tipo, atuam nas enzimas que estão diretamente envolvidas na via de folato, inibindo a síntese de DNA responsável pela formação de proteínas essenciais que estão presentes na membrana externa do parasito e divisão células do mesmo. A fim de diminuir os efeitos colaterais destes medicamentos, geralmente é suplementado junto ao tratamento, ácido fólico. Ainda

assim efeitos colaterais como anemia megaloblástica (inibição da síntese de DNA na produção de eritrócitos) e outros efeitos associados produção de células presentes no sangue, estão associados ao tratamento (DE SOUZA, 2006). Faz-se necessária portanto, uma pausa durante o tratamento com os antifolatos devido à alta incidência dos efeitos colaterais presentes durante o processo, podendo significar risco a vida de pacientes (MONTROYA *et al*, 2004).

A Pirimetamina (Fig. 4) conjugada com a sulfadiazina é o tratamento padrão da toxoplasmose, sendo capaz de inibir a enzima diidrofolato-redutase, impedindo a conversão do ácido fólico para ácido folínico, reduzindo drasticamente a síntese de DNA e RNA (ANDERSON e MORSE, 1996). Isso leva a interrupção do ciclo de vida do parasito, mas atinge também de forma negativa o hospedeiro. Esse efeito colateral pode ser parcialmente revertido com a administração concomitante de ácido folínico que se converte em derivados reduzidos de ácido fólico (ex: Tetraidrofolato) sem a necessidade da diidrofolato-redutase inibida pela Pirimetamina. A administração de doses altas de Pirimetamina. A administração de doses altas de Pirimetamina pode provocar vômitos, tremores, convulsões e depressão da medula óssea (REMGINGTON., 2001).



**Fig. 4. Fórmula molecular da Pirimetamina.** (5-(4-clorofenil) -6-etil-2,4-pirimidinadiazina) (O NEAL, 2006).

A Sulfadiazina (Fig. 5) é um análogo estrutural que compete pelo ácido paraminobenzóico contra o parasito, uma vez que este ácido é utilizado pelo *T. gondii* na síntese de ácido fólico (EYLES e COLEMAN, 1995). A administração de tal fármaco não é indicada ao final do terceiro trimestre de gravidez, podendo causar efeitos colaterais no sistema nervoso do neonato (REMGINGTON *et al.*, 2001).



**Fig. 5. Fórmula molecular da sulfadiazina.** (4-amino-N-pyrimidin-2-ylbenzenesulfonamide) (HENRY, 1973).

O tratamento durante a gestação é preferencial, podendo ser realizado com espiramicina, uma vez que este fármaco possui ação efetiva contra *T. gondii* (NIEL *et al.*, 1981). Este medicamento é administrado com o intuito de reduzir a transmissão do parasito da mãe para o feto na fase aguda da infecção através da placenta (FORESTIER *et al.*, 1987). Porém também existem vários efeitos colaterais com a utilização deste medicamento, administrados em doses altas, produz vasoespasmos, calafrios, vertigens, diarreia, arritmia cardíaca entre outros efeitos adversos (STRAMBADIALE *et al.*, 1997).

Apesar da comprovada eficácia, os fármacos descritos acima causam uma série de efeitos adversos que podem prejudicar o organismo do indivíduo infectado. Portanto, estudos atuais buscam formas menos agressivas para o tratamento da toxoplasmose, substâncias de origens naturais vem sendo o foco para tal objetivo, como plantas por exemplo (CARVALHO e FARHART, 1999).

Fármacos eficazes contra *T. gondii* além dos efeitos colaterais negativos pra o indivíduo tratado, podem causar diferentes alterações na forma proliferativa do parasito, podendo converter taquizoíto, forma presente na fase aguda, para sua forma de baixo gasto calórico, bradizoíto, que estão presentes na fase crônica da doença em forma de cistos teciduais (SILVA *et al.*, 2015 ; PORTES *et al.*, 2015). Compostos de naftoquinona foram testados contra *T. gondii* e foi demonstrado a conversão de taquizoíto em bradizoíto através da marcação por Lectina DBA (*Dolichus Biflorus Agglutinin*), que marca especificamente o carboidrato N-acetilgalactosamina, que está presente na parede dos cistos teciduais (ZHANG *et al.*, 2001). Outras alterações

podem ser visualizadas no trabalho de Portes *et al.* (2015), no qual o tratamento com um composto sintético contendo núcleo de ferro induziu morte celular envolvendo autofagia, verificada pela marcação do parasito por LC3B, e apoptose, observada pela técnica TUNEL, que detecta a fragmentação de DNA.

### **1.7 Algas marinhas, fonte de Polissacarídeos sulfatados**

Algas marinhas são organismos filogeneticamente distantes dos mamíferos, portanto, o risco por contaminação por partículas virais é mínimo. Elas podem ser divididas em 3 grandes grupos: algas verdes, marrons e as vermelhas. São também os únicos vegetais que possuem uma significativa quantidade de polissacarídeos sulfatados em sua composição (CÂMARA, 2010).

Nas algas vermelhas, são encontradas grandes quantidades de galactanas sulfatadas. A atividade anticoagulante para este composto foi inicialmente descrita por Chargaff *et al.* (1936) e, atualmente, vários pesquisadores têm se interessado por este tipo de substância. Das algas marrons, é possível obter substâncias denominadas fucanas (homofucanas) e as fucoïdanas (heterofucanas); que são polissacarídeos constituídos principalmente de L-fucose sulfatada, contudo outros monossacarídeos podem ser encontrados e atualmente são os polissacarídeos de origem vegetal mais bem estudados com relação a sua atividade anticoagulante (BOISSON-VIDAL *et al.*, 1995; DURIG *et al.*, 1997; HAROUN-BOUHEDJA *et al.*, 200; ALVES, 2000). As algas verdes apresentam polissacarídeos sulfatados mais heterogêneos que são ricos em galactose, manose, xilose, arabinose, glicose e ou ácidos urônicos. A complexibilidade na estrutura desses compostos se dá devido às muitas possibilidades de ligações entre os monossacarídeos e a distribuição de grupamento sulfato.

Assim cada polissacarídeo pode possuir conformação estrutural única e, portanto, pode apresentar atividades biológicas diferentes de acordo com sua estrutura. A identificação de um novo polissacarídeo sulfatado, se tornou alvo para testes contra a toxoplasmose no presente estudo (CÂMARA, 2010).

Algumas atividades destes compostos já se encontram disponíveis na literatura. Atividades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, anticoagulante e antitrombótica, imunológica e anticancerígena já foram descritas para diferentes tipos de polissacarídeos (GURPILHARES *et al.*, 2016).

No presente estudo, foi avaliada a ação da fração F9, pré selecionada em

estudos anteriores realizados por obtida da alga *Dictyota caribaeae* contra o crescimento de *T. gondii*. *Dictyota caribaeae* é uma espécie de *Phaeophyceae* da família das *Dictyotaceas*.

## 2. OBJETIVO

**Objetivos gerais:** Foi analisada a eficácia da fração F9 extraída da alga marinha *Dictyota caribaeae* contra o crescimento de *T. gondii*.

**Objetivos específicos:**

- Avaliar em diferentes concentrações a eficácia da fração F9 contra taquizoítos de *T. gondii* em diferentes tempos.
- Determinar o potencial de citotoxicidade da fração F9 observando possíveis mudanças morfológicas no parasito e célula hospedeira após tratamento.
- Verificar se o tratamento com a fração F9 converte a forma taquizoíto de *T. gondii* em bradizoíto.
- Averiguar se autofagia está envolvida na morte celular de *T. gondii* após tratamento das células hospedarias infectadas com a fração F9.

## 3. METODOLOGIA

### 4.1. Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

Taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH) foram mantidos por passagens intraperitoneais em camundongos suíços. Após 48h de infecção, os parasitos foram ser coletados em solução salina de tampão fosfato (PBS) através de lavagem peritoneal. O lavado peritoneal sofreu centrifugação (100g; 5'; 4°C), o sobrenadante coletado foi centrifugado (1000g; 10'; 4°C) para a obtenção das formas taquizoítos. Os parasitos contidos no sedimento foram ressuspensos em DEME (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) e diluídos em fixador (formaldeído 4% em PBS) para quantificação através da câmara de Neubauer no microscópio óptico convencional.

### 4.2. Cultura de LLC-MK2.

As células fibroblásticas LLC-MK2 (Epitélio de rim de *Macaca mulatta*)

foram cultivadas em DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%, e o pH do meio foi mantido numa atmosfera com CO<sub>2</sub> a 5%, e a 37°C. As células multiplicaram-se até a formação de monocamada, aderente à superfície do frasco de cultura. A subcultura dessas células foi obtida a partir de culturas confluentes, enquanto a infecção com o parasito foi realizada em culturas subconfluentes. As células foram subcultivadas, a partir de suspensões celulares obtidas por tripsinização das garrafas de células em monocamada. Todas as operações envolvidas no manuseio das células e meios de cultura celular foram efetuadas em condições de assepsia, com o uso de material estéril em câmara de fluxo laminar.

### **4.3. Obtenção de frações etanólicas do extrato de *Dictyota caribeeae***

O extrato de alga *Dictyota caribeeae* foi cedido pelo professor Dr. Leonardo Paes Cinelli do Laboratório Integrado de Prospecção em Produtos Bioativos localizado na UFRJ (Campus-Macaé). A alga foi coletada na região marítima do Norte Fluminense, e após secagem foi macerada e tratada 4 vezes, com 2 volumes de acetona, por 12 h para despigmentação e delipidação. A alga macerada foi decantada, o resíduo colocado para secar (temperatura ambiente), sendo digerida com papaína a 60° C por mais 24 h e secas novamente em temperatura ambiente (GURPILHARES *et al.*, 2016).

As frações foram obtidas por adição de etanol após o material estar completamente seco. Inicialmente um volume de 10% de etanol foi adicionado ao extrato da alga. A preparação foi mantida a 4° C por 24 h, centrifugado a 2000 g por 20 min e o sobrenadante denominado fração F9. O sedimento recebeu nova quantidade de etanol e o processo repetido. Adição de 30, 80, 150, 300% de etanol geraram, respectivamente, as frações F23, F44, F60 e F75. As frações etanólicas foram liofilizadas, reconstituídas em DMEM e filtradas (0,22 µm). Estudo prévio (RODRIGUES, 2017) indicou que a fração F9 foi a mais promissora no controle do crescimento de *T. gondii* intracelular. Todos os experimentos realizados nesse trabalho formam com essa fração.

### **4.4. Osmolaridade da fração F9**

Para avaliar se a adição da fração F9 em DMEM alterava o nível de osmolaridade utilizamos um Osmômetro (modelo Osmette 5.004). Inicialmente o aparelho foi calibrado com solução padrão, e realizado a leitura de DMEM puro e

contendo a fração F9 nas concentrações de 1000, 500 e 250 µg/ml.

#### **4.5. Viabilidade celular**

Para o ensaio de viabilidade dois testes foram utilizados: MTT e LDH.  $1 \times 10^5$  células LLC-MK2 foram plaqueadas em placa de 96 poços, cultivadas em DMEM suplementadas com 5% de soro fetal bovino (SFB). Após 24 h as células foram lavadas com PBS estéril quente, e então foi adicionada a fração F9 em 5 diferentes concentrações (1000, 500, 250, 125, 62, e 31 µg/ml), para o controle. Para o controle positivo as células foram cultivadas apenas com DMEM suplementado com SFB, sem a adição da F9. Para o controle negativo, as células foram tratadas com DMEM mais a adição de 10% de Triton X-100 4 h antes da leitura. Após 48 h de interação, o sobrenadante da cultura foi removido, adicionando então 15 µl de solução MTT diluída em DMEM (5mg/ml) a cada poço, atuando sob a cultura por 4 h. Após esse período, cristais de formazan formados pela metabolização do composto MTT nas mitocôndrias celulares foram solubilizados com dimetil sulfóxido. A placa foi centrifugada a 400g por 7 minutos, 100 µl foram coletados e transferidos para uma nova placa, que foi submetida a leitura em leitor de micropoços a um comprimento de onda de 50 nm no leitor SoftMaxPro® 6.0. Células tratadas sem a adição da F9 e de Triton X-100 foram consideradas 100% viáveis. Para o teste de LDH foi utilizado no sobrenadante da cultura o kit Doles®. Para a quantificação, 50 µl do sobrenadante da cultura foi transferido para uma nova placa de 96 poços, sendo adicionado a solução A por 3 minutos e a solução B, ambos presentes no Kit, por 5 minutos. As incubações foram realizadas no escuro a uma temperatura de 37°C. A placa foi então analisada no mesmo leitor de micropoços a 492 nm. Os dados foram plotados e trabalhados no programa Prisma Graphpad 6.0®. Células tratadas sem a adição da F9 e de Triton X-100 foram consideradas 100% viáveis e livre de qualquer liberação de LDH. Células cultivadas com Triton X-100 foram consideradas 100% mortas com o máximo de liberação de LDH.

#### **4.6. Microscopia óptica**

Para esta análise as células LLC-MK2 foram plaqueadas a uma concentração de  $3 \times 10^4$  em sob lamínulas de vidro estéreis alocadas em placa de 24 poços,



cultivadas em DMEM suplementado com SFB a 10%, e o pH do meio foi mantido numa atmosfera com CO<sub>2</sub> a 5%, e a 37°C durante 24 h. Após esse período, foi retirado o sobrenadante da cultura, as lamínulas contendo as células foram então lavadas 2 vezes com PBS quente. Feito isso adicionou-se 100 µl de DMEM puro a cultura, Taquizoítos recém extraídos do peritônio de um camundongo infectado, foram centrifugados, e adicionados a cultura em uma proporção de 2:1. A placa é então incubada em estufa de CO<sub>2</sub> sob as mesmas condições anteriormente citadas durante 2 h. Retirou-se novamente o sobrenadante da cultura, lavou-se novamente cada poço 1 vez com PBS estéril quente, retirou-se então o PBS dos poços e foi adicionada a fração F9 em 3 diferentes concentrações (500, 250 e 125 µg/ml) µl µl em triplicatas e encubadas durante um período de 24 e 48 h. Para o controle positivo, células infectadas com taquizoítos de *T. gondii* foram cultivadas com DMEM suplementado com 5% de SFB livre da adição do composto. Após as 24 e 48 h, as lamínulas contendo as células serão coletadas e fixadas em solução de formaldeído 4% em PBS, coradas com Giemsa 10% em água destilada, desidratadas em diferentes concentrações de acetona-xilol: 1) 100% acetona; 2) 100% acetona; 3) 70% acetona e 30% xilol; 4) 30% acetona e 70% de xilol; 5) 10% acetona e 90% de xilol; 6) 100% xilol. Após desidratação as lamínulas serão montadas sobre gotas de Entellan. As lâminas prontas serão observadas ao microscópio, e será realizada a contagem de células infectadas, células não infectadas, e taquizoítos por células infectadas para o cálculo de índice de infectadas e realização das análises estatísticas e obtenção do valor índice de inibição do composto que elimina 50% da carga parasitária (IC50).

#### **4.7. Morte celular por autofagia.**

As células LLC-MK2 sobre lamínulas a uma concentração de  $3 \times 10^4$  em placa de 24 poços foram infectadas com taquizoítos, tratadas com a fração F9 nas concentrações de IC50 e dobro do IC50 durante o período de 24 e 48 h em duplicatas. Após este período, as lamínulas foram coletadas, lavadas com PBS e fixadas com 4% de formaldeído recém-preparado em tampão PHEM (60 µM PIPES [ácido piperazina-N, N'-bis (2-etanossulfônico)], HEPES 20 µM, EGTA de 10 µM, MgCl<sub>2</sub> a 5 µM e 70 µM de KCl, pH 7,2). Após a fixação, as células foram lavadas, permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 em tampão PHEM durante 10 minutos, incubadas com NH<sub>3</sub>Cl de 100 µM durante 30 minutos e depois incubadas com tampão PHEM contendo albumina de soro

bovino a 3% (PHEM- BSA) durante 30 minutos à temperatura ambiente junto a adição de anticorpo policlonal de coelho LC3B (diluição 1: 100). Após marcação com LC3B, as células foram incubadas com anticorpo de cabra anti-coelho Alexa Fluor 546 (diluição 1:100) (Molecular Probes). As células foram lavadas com PHEM e as lamínulas com células foram montadas em ProLong Gold com ou sem 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI). A percentagem de células com vacúolos contendo parasitos positivos para LC3B foi calculada após quantificação do número de células positivas entre 100 células infectadas em pelo menos duas diferentes lamínulas por experimento.

#### **4.8. Conversão de taquizoíto em bradzoíto (Lectina DBA).**

As células LLC-MK2 sobre lamínulas a uma concentração de  $3 \times 10^4$  em placa de 24 poços foram infectadas com taquizoítos, tratadas com a fração F9 nas concentrações de IC50 e dobro do IC50 durante o período de 24 e 48 h em duplicatas. Após este período, as lamínulas foram coletadas, lavadas com PBS e fixadas com 4% de formaldeído recém-preparado em tampão PHEM (60  $\mu$ M PIPES [ácido piperazina-N, N'-bis (2-etanossulfónico)], HEPES 20  $\mu$ M, EGTA de 10  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> a 5  $\mu$ M e 70  $\mu$ M de KCl, pH 7,2). Após a fixação, as células foram lavadas, permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 em tampão PHEM durante 10 minutos, incubadas com NH<sub>3</sub>Cl de 100  $\mu$ M durante 30 minutos e depois incubadas com tampão PHEM contendo albumina de soro bovino a 3% (PHEM- BSA) durante 30 minutos à temperatura ambiente junto a adição de lectina DBA (*Dolichus biflorus agglutinin*) conjugada com isotiocianato de fluoresceína durante 1 hora (10  $\mu$ g/ml) (Sigma Aldrich). Após a marcação, as células foram lavadas com PHEM e as lamínulas com células foram montadas em ProLong Gold com ou sem 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI).

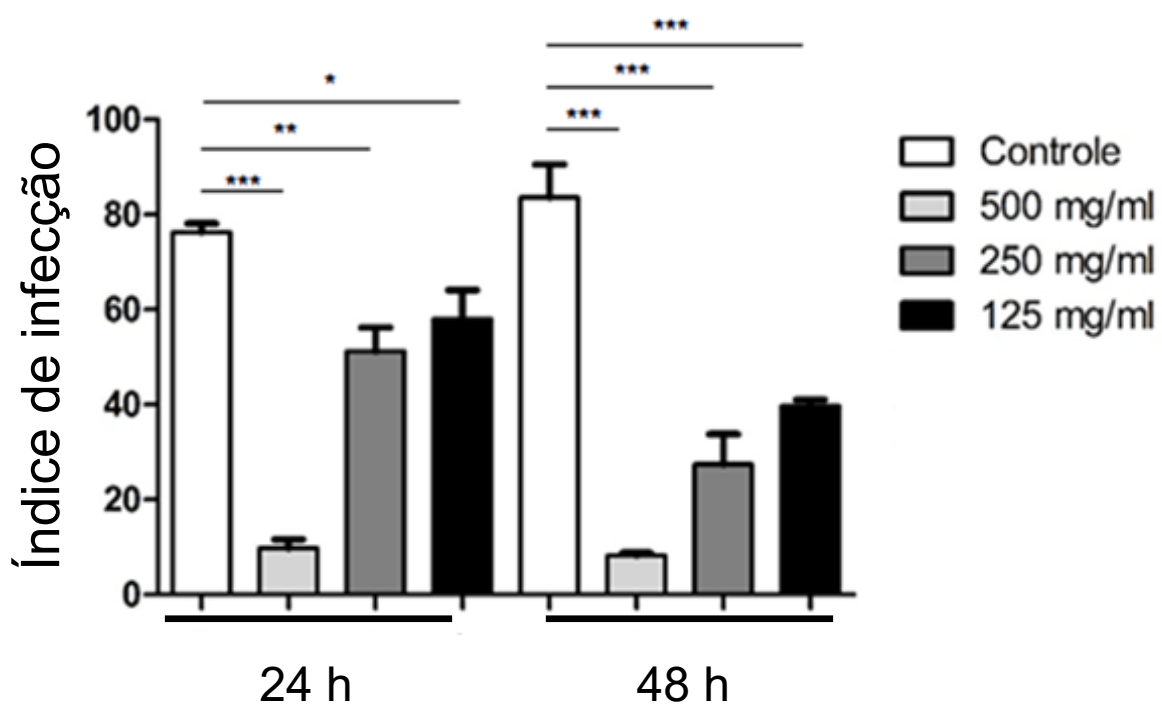
#### **4.9. Ensaios estatísticos.**

Os testes foram realizados em triplicado e os dados mostrados foram de um experimento representativo de três experimentos independentes com resultados semelhantes. Os valores foram expressos no desvio médio  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo teste pós-teste da Turquia. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para  $P < 0,05$ . Os valores de IC50 foram calculados por regressão não linear (Eq. (1)) com intervalos de confiança de 95%.

## 4. RESULTADOS

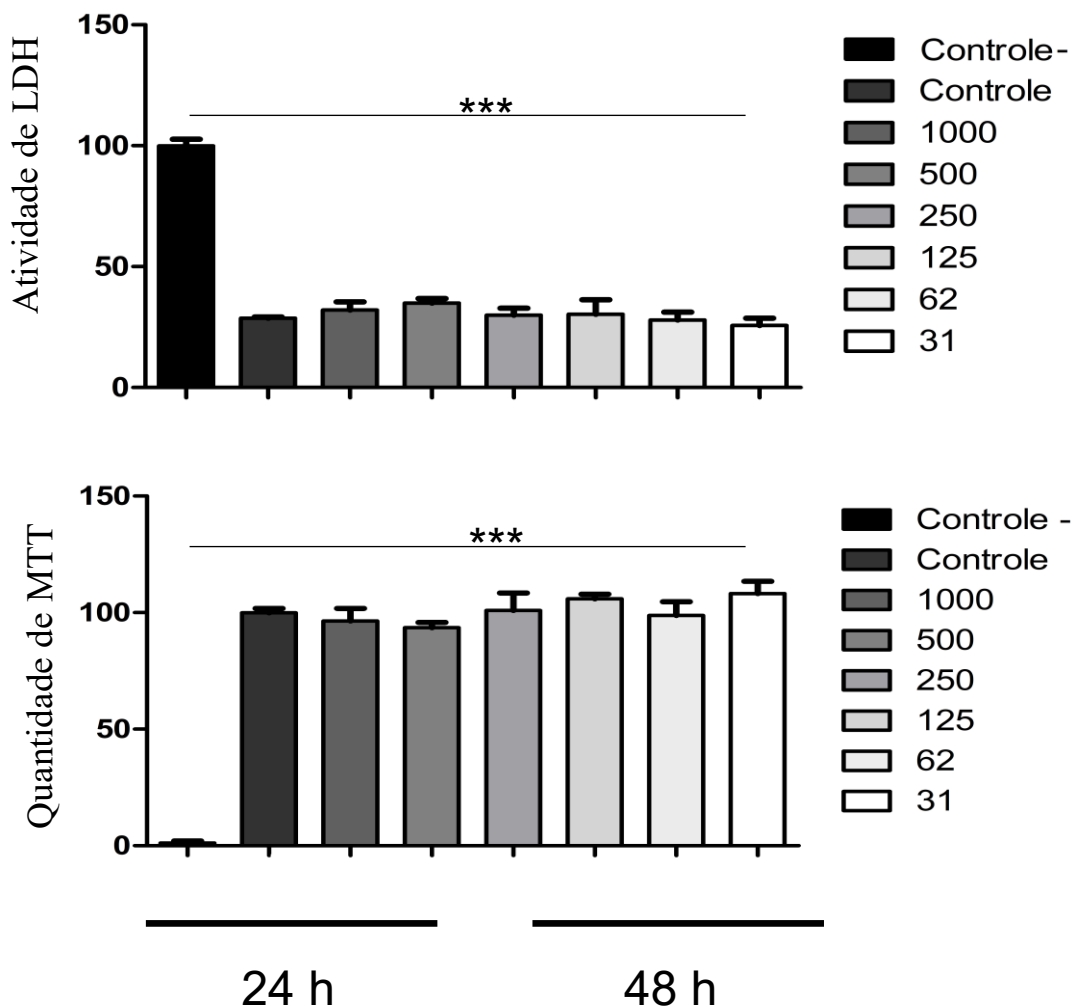
Não houve diferença nas leituras de osmolaridade comparando DMEM puro (232 mOsm) com DMEM contendo a fração F9 em 1000 µg/ml (239 mOsm), 500 µg/ml (234 mOsm) e 250 µg/ml (231 mOsm).

O tratamento com a fração F9 das células infectadas por 24 e 48 h resultou em menor índice de infecção que correlacionou positivamente com o aumento da concentração da fração F9 (fig. 6).



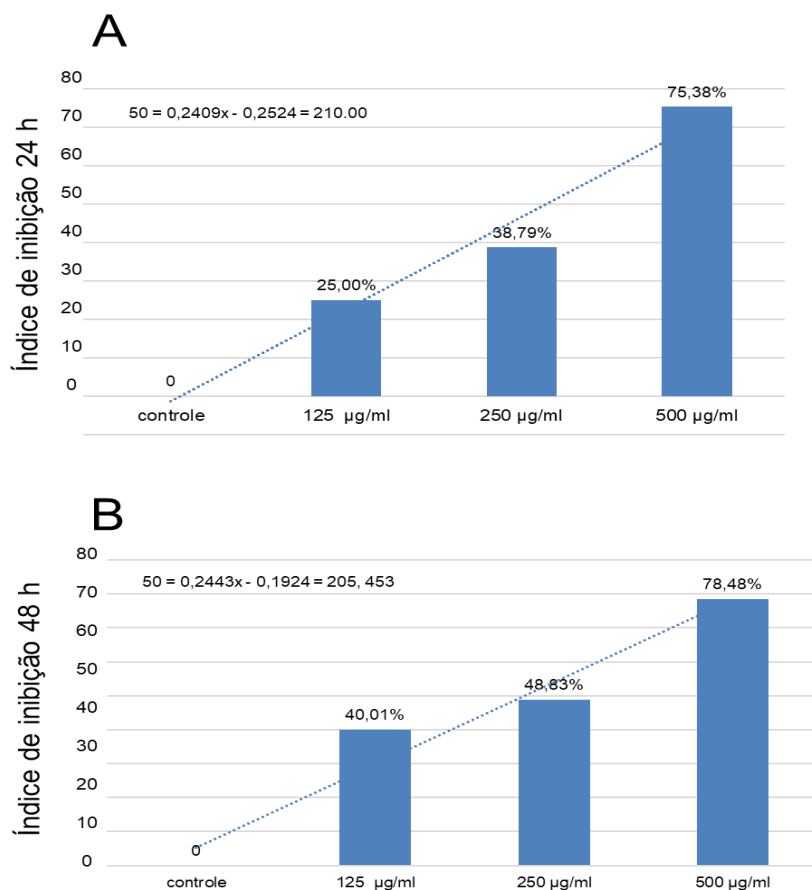
**Fig. 6. Índice de infecção de *Toxoplasma gondii*.** Células LLC-MK2 após 24 h e 48 h de infecção, tratadas ou não com a fração F9 de *Dyctiota caribae*. Diferença significativa indicada por \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*  $P < 0,0001$ , pelo teste ANOVA *one way* e pós-tesde de Tukey.

Na análise de viabilidade celular, pelos testes de liberação da lactato desidrogenase e da metabolização mitocondrial do MTT, foi possível verificar que a fração F9 não demonstrou citotoxicidade as células LLC-MK2 no período de 48 h da incubação em 6 diferentes concentrações (fig. 7). Pode-se verificar que o potencial de citotoxicidade não diferiu significativamente em relação ao controle positivo (fig. 7).

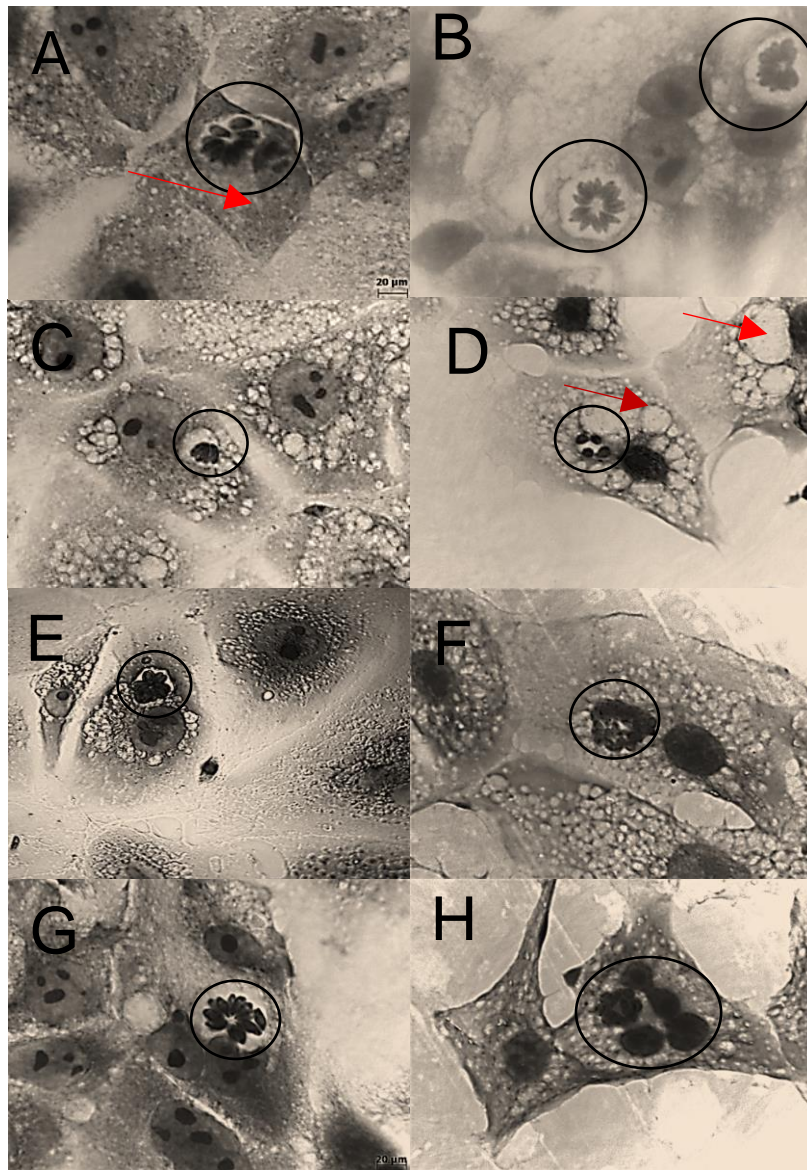


**Fig. 7. Viabilidade Celular.** Viabilidade das células hospedeiras após tratamento como a fração F9 de *Dyctiota caribaea*. As células hospedeiras foram tratadas por 48 h com a fração F9 em concentrações crescentes, iniciando com 31 µg/ml até 1000 µg/ml. A toxicidade da fração para as células hospedeiras foi avaliada baseando-se na metabolização do reagente MTT (A) e na liberação de Lactato desidrogenase (LDH) (B). Diferença significativa de células tratadas em relação ao controle positivo por análise de variancia One-way ANOVA \*\*\*  $P < 0,0001$ ; não existe diferença entre as células tratadas.

A análise da concentração do IC50 foi realizada através da obtenção de uma reta de regressão entre índice de infecção em cada concentração da fração F9 utilizada. Obteve-se IC50 de 210,0 µg/ml com 24 h de tratamento (fig. 8A) e de 205,5 µg/ml com 48 h de tratamento (fig. 8B).



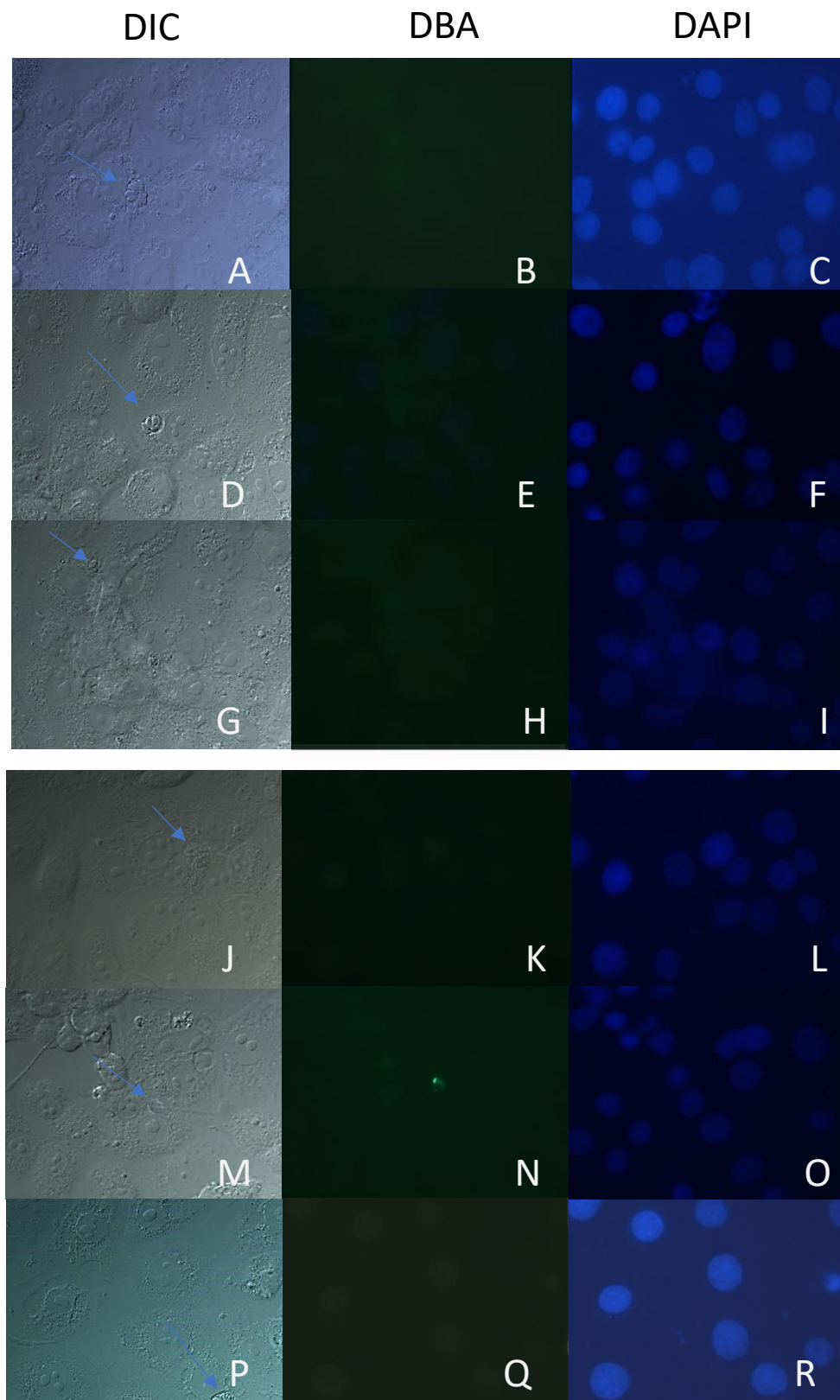
**Fig. 8. Índice de inibição do crescimento de *Toxoplasma gondii*.** Células LLC-MK2 causada pelo tratamento da fração F9 de *Dyctiota caribeeae*. A. Após 24 h. B. Após 48 h. Metade da concentração inibitória foi calculada e pode ser vista no canto superior esquerdo da figura. As imagens de campo claro das células tratadas (fig. 9) corroboram os resultados de índice de infecção, indicando redução no crescimento de parasitas por células hospedeiras quando se compara o grupo controle ao grupo tratado nos períodos de 24 e 48 h. Foi possível verificar mudanças na morfologia de *T. gondii* e estruturas semelhantes a vacúolos parasitóforos no citoplasma.



**Fig. 9. Imagens de campo claro de células LLC-MK2 infectadas com *Toxoplasma gondii*.** Células tratadas ou não com a fração F9 de *Dyctiota caribaea*. A e B: Células não tratadas cultivadas por 24 h e 48 h. Observa-se a formação de rosácea (aro preto) no citoplasma das células hospedeira. Células tratadas com 500 µg/ml por 24 h (C) e 48 h (D), setas verdes indicam presença de estruturas semelhantes a células em processo inflamatório. Rosáceas atípicas (aros pretos) são mostradas em ambos os tempos, com menor número de parasitos em seu interior além de mudança na morfologia de taquizoítos. Células tratadas com 250 µg/ml por 24 h (E) e 48 h (F). A presença de rosácea (aro preto) com maior número de taquizoítos dentro é observada quando comparada às imagens “C” e “D”, mas menos parasitos são observados quando comparado com as imagens “A” e “B”. Em F nota-se alteração na morfologia do parasito. Células tratadas com 125 µg/ml por 24 h (G) e 48 h (H). Em G, nota-se uma semelhança a presente (aro preto) com a observada no controle. Em H, pode-se observar mudança morfológica na morfologia do parasito.

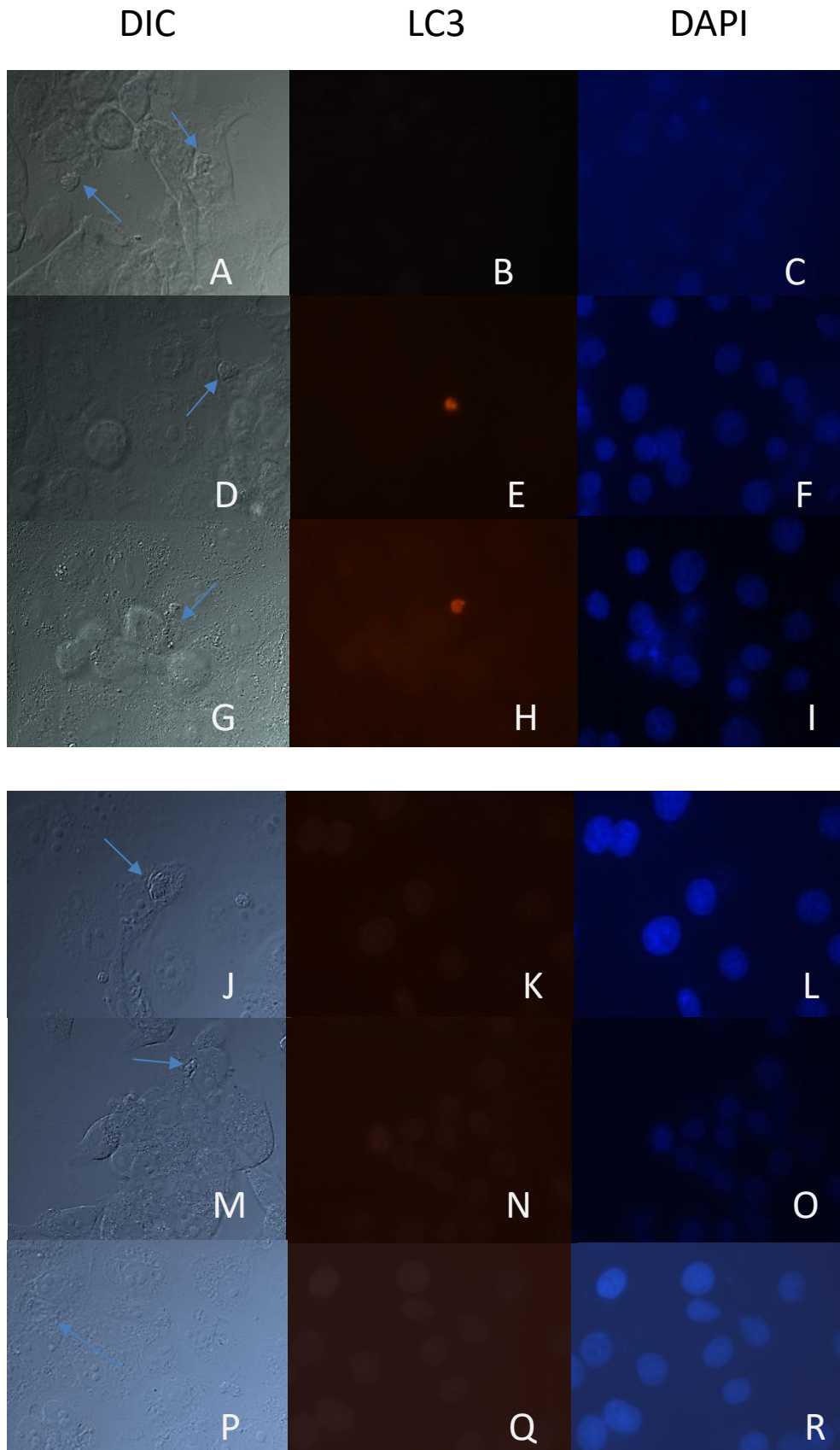
As análises da possível conversão de taquizoítos para badzoítos e para avaliação de morte celular por autofagia geraram resultados negativos. Mesmo havendo

redução no número de parasitos, não houve ligação da lectina DBA e do LC3 como pode ser verificado nas figuras 10 e 11, respectivamente.



**Fig. 10. Avaliação de cistogênese por marcação com lectina DBA.** Em microscópio óptico de fluorescência, células infectadas observadas por contraste interferencial (DIC)

apresentam parasito (seta). Células também foram marcadas com a lectina DBA e por DAPI. Células infectadas sem tratamento por 24 h (A, B, C) e 48 h (J, K, L). Células infectadas tratadas com a fração F9, 205,5  $\mu\text{g/ml}$  por 24 h (D, E, F) e 48 h (M, N, O). Células infectadas tratadas com a fração F9, 410,9  $\mu\text{g/ml}$  por 24 h (G, H, I) e 48 h (P, Q, R). Não houve marcação para a lectina DBA.





**Fig. 11. Avaliação de morte por autofagia por marcação de LC3 em análise de imunofluorescência.** Células infectadas observadas por contraste interferencial (DIC) apresentam parasito (seta). Células também foram marcadas para LC3 e por DAPI. Células infectadas sem tratamento por 24 h (A, B, C) e 48 h (J, K, L). Células infectadas tratadas com a fração F9, 205,5 µg/ml por 24 h (D, E, F) e 48 h (M, N, O). Células infectadas tratadas com a fração F9, 410,9 µg/ml por 24 h (G, H, I) e 48 h (P, Q, R). Não houve marcação para LC3.

## 5. Discussão

*Toxoplasma gondii* é um parasito protozoário intracelular obrigatório, agente causador da toxoplasmose (SIBLEY *et al.*, 2010). Este parasito consegue invadir a célula hospedeira burlando seu sistema de defesa. Porém, em hospedeiros imunocompetentes, o parasito não consegue se proliferar, assumindo forma latente de baixo consumo de energia. Já em hospedeiros imunodeficientes, este parasito traz grande risco a saúde, podendo levar a morte. A administração de sulfadiazina combinado a pirimetamina e ácido folínico é o tratamento padrão, porém seus efeitos colaterais são demasiados adversos. Espécies de algas marinhas são fonte de fármacos com potencial terapêutico, que uma vez naturais podem ser menos agressivos ao hospedeiro. Algas marinhas são ricas em polissacarídeos sulfatados que aqui foram testados contra *T. gondii*. A fração F9 não foi tóxica as células hospedeiras. Controlou o crescimento do parasito em células LLC-MK2. Induziu alterações morfológicas, mas não foi detectado indício de conversão de taquizoítos para bradizoítos e a morte celular do parasito não envolveu LC3.

Tendo como um dos principais problemas os efeitos colaterais presentes nos medicamentos utilizados na quimioterapia de toxoplasmose atualmente comercializados, uma preocupação no nosso teste foi em relação a efeitos negativos na célula hospedeira durante tratamento com a fração F9. Porém, os testes de viabilidade celular, LDH e MTT, demonstraram viabilidade acima de 95%, quando comparado as células controle, resultados similares ao encontrado nos testes feitos com naftoquinona (DA SILVA *et al.*, 2015). Em comparação com a utilização de outras formas de tratamento com a toxoplasmose utilizando fontes de origens vegetais, a fração F9 utilizada nos nossos testes foi a que menos apresentou efeitos citotóxicos às células hospedeiras. Em testes realizados por Souza (2018) maiores concentrações testadas do extrato etanólico (500 µg/mL, 250 µg/mL), fração acetato de etila (500 µg/mL, 250 µg/mL) e óleo essencial (500 µg/mL) da planta *Siparuna guianensis* contra *T. gondii* reduziram em mais de 50% a viabilidade celular da célula hospedeira. A osmolaridade do DMEM após a adição da fração F9, na concentração mais alta utilizada, não foi afetada, indicando que essa característica do meio de cultivo das células não influenciou negativamente as células. Atualmente na literatura, não existe testes realizados utilizando polissacarídeos sulfatados da *alga D. caribae* contra *T. gondii* ou qualquer outro parasito do filo Apicomplexa.

Pôde-se determinar que a fração F9 reduziu em até 78% o crescimento do parasito quando comparado com o controle de 48 h. Esse resultado indicou que além dos efeitos já relatados na literatura, como anticoagulantes, antitumorais, antioxidantes entre outros, em outras espécies de algas do mesmo grupo (BOISSON-VIDAL *et al.*, 1995), extratos oriundos de alga marinha, especificamente de *D. caribae* apresenta atividade antiparasitária. Mesmo utilizando concentrações consideravelmente altas, sendo a maior de 1000 ug/ml, é possível concluir analisando o índice de infecção (fig. 1) e de viabilidade celular (fig. 2), que a fração F9 tem um bom índice de seletividade, não sendo agressiva às células hospedeiras e ao mesmo tempo impedindo o avanço da reprodução de *T. gondii*.

As imagens de microscopia óptica evidenciaram e corroboraram com o resultado de menor crescimento de taquizoítos por célula infectada. Pôde-se notar a presença de estruturas semelhantes a processos inflamatórios no citoplasma, principalmente nas imagens C e D da figura 4 relativas ao tratamento na concentração de 125 ug/ml em 24 e 48 h, respectivamente, característica que não é vista nas demais imagens. Nota-se também uma alteração da morfologia do parasito nas imagens D, F e H da figura 4 no tempo de tratamento de 48 h. Em um estudo com polissacarídeos extraídos da alga marinha *Anacardium occidentale L.* estruturas semelhantes às observadas nos nossos resultados, foram visualizadas durante o processo inflamatório no processo de cicatrização. Neste estudo, a interação com o extrato da alga auxiliou no processo anti-inflamatório (SCHIRATO *et al.*, 2006). Não se pode concluir qual a causa da formação dessas estruturas, e nem se elas possuem alguma relação com as mudanças na morfologia dos parasitos observados após tratamento com a fração F9, porém a ausência desta característica nas imagens relativas as concentrações de 250 e 500 ug/ml em 24 e 48 h, sugere que não só o tempo de tratamento com a fração F9, mas também o aumento de sua concentração, possam ter interferido de forma positiva para a célula hospedeira neste processo e de forma negativa para o parasito.

A análise do IC50 determinou concentração de 205, 243 µg/ml no período de 48 h, os testes foram feitos utilizando as 3 concentrações para as análises de inibição de crescimento *in vitro*. Este valor foi utilizado como base nos testes posteriores, garantindo efeito balanceado contra *T. gondii*. Resultado semelhante foi obtido na utilização do óleo essencial da planta *Siparuna guianensis* contra *T. cruzi*, no qual foi obtido um valor de IC50 de 209, 30 µg/mL (ANDRADE *et al.*, 2015).

Nas análises de avaliação de cistogênese (marcação com Lectina DBA) e possível morte celular por autofagia (marcação de LC3), as imagens obtidas demonstraram resultado negativo para ambos os ensaios. Foi utilizada para os testes o dobro da concentração de IC50 no período de 24 e 48 h. Porém ainda foi perceptível a redução no número da carga parasitária no interior das células hospedeiras. Esses resultados divergem dos resultados obtidos por Portes *et al.* (2017) e Da Silva *et al.* (2015) nos quais metalocomplexos e naftoquinona, respectivamente, foram capazes de induzir morte celular por apoptose e cistogênese em *T. gondii*. O fato de não ter ocorrido conversão em bradzoíto sugere que a fração F9 não é capaz de gerar estresse metabólico ou mudanças de característica biológica que levassem a tal resultado. De certa forma, isso dificulta o entendimento da redução do número de taquizoítos nas células hospedeiras, porém, também demonstra que a fração é capaz de impedir o crescimento sem que a conversão ocorra.

Ainda não foi possível chegar a uma conclusão de que forma a fração F9 do extrato de *D. caribae* inibe o crescimento do parasito nas células hospedeiras. Estudos da atividade de outros extratos de alga marinha com atividades anti-protozoários demonstram redução no crescimento dos parasitas nas células hospedeiras (ORHAN *et al.*, 2006), no qual foi mostrado que 5 tipos diferentes de extratos de algas marinhas pertencentes ao grupo verde (*C. glomerata*, *D. dichotoma*, *S. natans* e *U. lactuca*) demonstram atividades anti-plasmodium. Ademais, alguns compostos de algas vermelhas demonstram possuir bioativos com efeitos antimaláricos (LANE *et al.*, 2009). Nesses estudos, todos os testes demonstraram baixa toxicidade as células hospedeiras.

É de conhecimento que as algas são ricas em metabólitos secundários, como taninos, flavonoides, ácidos fenólicos e etc. Uma explicação para redução do número de taquizoítos nas células hospedeiras podem estar associado a ação desses metabólitos secundários. Isso foi visto em Adams *et al.* (2005) no qual houve a inibição de invasão de merozoítos de *P. falciparum* nos eritrócitos em testes feitos com heparina, e também em Carlson *et al.* (1992) e Rowe *et al.* (1994), que relatam o impedimento no rompimento de rosetas do *P. falciparum* utilizando glico-conjugados sulfatados. Não se elucidou a composição molecular da fração F9, porém se tem conhecimento da grande quantidade de polissacarídeos sulfatados presentes, cada um com características de composição distintas. Essa diversidade molecular possibilita possivelmente um leque de atividades diferentes que esse composto pode induzir. Estudos para obter a estrutura do

composto estão sendo realizados no momento pela equipe do Professor Leonardo Paes Cinelli.

Os resultados obtidos encorajam aprofundar os conhecimentos sobre a ação do extrato e sua atividade contra *T. gondii* e outros protozoários, abrindo portas para testes com diferentes frações oriundas de distintas espécies de algas, diversificando ainda mais as possíveis formas de tratamentos atualmente disponíveis.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos é correto afirmar que a fração F9 do extrato da alga marinha *D. caribae* reduziu o crescimento de *T. gondii* nas células LLC-MK2. Ainda que as imagens de campo claro demonstraram possíveis mudanças morfológicas, não é possível afirmar o que na fração foi responsável por tal mudança. Em relação ao potencial de toxicidade de outros quimioterápicos presentes no mercado farmacêutico para toxoplasmose, como a sulfadiazina e pirimetamina, o extrato demonstrou baixa toxicidade as células hospedeiras, ainda que em concentrações de uso não muito baixas. Não foi possível elucidar até o momento a forma de ação do extrato no controle do crescimento de *T. gondii*. De forma geral, nossas pesquisas mostram que existem formas menos agressivas de tratamento a serem descobertas, existem muitas frações diferentes que ainda não foram testadas, e os resultados aqui mostrados são uma prova disto.

## **7. PERSPECTIVAS**

Ainda são necessários mais teste *in vitro*, incluindo análise por microscopia eletrônica de transmissão e varredura, para tentar entender a forma de atuação do composto e para que seja possível analisar se o extrato atua de forma direta contra o parasito. Melhor conhecimento sobre os compostos bioativos presentes na fração F9 também é necessário para entender seu mecanismo de ação.

## 8. REFERÊNCIAS

- ALICIA KOMPALIC-CRISTO; CONSTANÇA BRITTO; OCTAVIO FERNANDES.  
**Molecular diagnosis of toxoplasmosis:** review. *Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 41, n. 4, p. 229-35, 2005.
- ALVES, L. G. **Polissacarídeos ácidos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga marinha *Sargassum vulgare*.** 2000. 86f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Bioquímica) Departamento de Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN, Natal, 2000.
- AMENDOEIRA, M.R.R; CAMILLO-COURA, L.F. **A brief review on toxoplasmosis in pregnancy.** *Scientia Medica (Porto Alegre)*, v. 20, n. 1, p. 113-119, 2010.
- ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; GOMES, M. S.; AZEREDO, C. M. O.; BATISTA, L. R.; SOARES, M. J.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. S. **Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 189-194, 2015.
- BEZERRA NETO, J. T. B.; RODRIGUES, J. A. G.; PONTES, G. C.; FARIAS, W. R. L. **Polissacarídeos sulfatados da alga *Caulerpa sertularioides* (GMEL.) Howe: Análise de metodologias de precipitação.** *Rev. Bras. Enga. Pesca*, v. 3, n. 2, p. 50-62, 2008.
- BLACK, M. W. & BOOTHROYD, J.C. **Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, n. 3, p.607–623, 2000.
- BOISSON-VIDAL, C.; HAROUN, F; ELLOUALI, M.; BLONDIN, C; FISCHER, A. M.; AGOSTINI, A.; JOZEFONVICZ J. **Biological activities of polysaccharides from marine algae.** *Drugs of the Future*, v.20, p.1237-1249, 1995.
- BOOTHROYD J.C.; GRIGG M.E. **Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease?** *Department of Microbiology and Immunology*, p. 438-442, 2002.
- BROSSIER, F.; JEWETT, T.J.; LOVET, J.L. & SIBLEY, L.D. **C-terminal processing of the *Toxoplasma* protein MIC2 is essential for invasion into host cells.** *J. Biol. Chem.*, v.278, p.6229-6234, 2003.
- CÂMARA, R. B. G. **Atividades anticoagulante e antioxidante de extratos brutos**



- ricos em polissacarídeos sulfatados das macroalgas marinhas marrons *Canistrocarpus cervicornis*, *Dictyota mertensii* e *Dictyopteris delicatula* e de Heterofucanas de *Canistrocarpus cervicornis*.** 2010. 81 f. Dissertação Mestrado em Bioquímica; Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.
- CANTOS G.A; PRANDO M.D; SIQUEIRA M.V; TEIXEIRA R.M. **Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos *antitoxoplasma gondii* e diagnóstico.** Rev. Assoc. Med. Bras., v.46 n.4 São Paulo, p. 335-341, 2000.
- MARTINS, C. **Toxoplasmose na gravidez.** Rev. Port. Clin. Geral, v. 18, n. 5, p. 333-340, 2002.
- CARVALHO, C.M.C.N.; FARHAT, C.K. **Toxoplasmose adquirida.** J. de Pediatria. 75, Supl. 1: S63-S67, 1999.
- CHARGAFF, E.; BRANCROFT, F. W.; STANLEY-BROWN, M. **Studies on the chemistry of blood coagulation II. on the inhibition of blood clotting by substances of high molecular weight.** J. Biol. Chem., v.115, p.155-161, 1936.
- CHEVOLOT, L.; MULLOY, B.; RATISKOL, J.; FOUCAULT, A.; COLIEC-JOUAULT S. **A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae.** Carbohydr. Res., v.330, p.529-535, 2001.
- CORREIA, V. C. S.; LIMA, N. O.; OLIVEIRA, F. A. S.; SANTOS, A. P. A.; TELES, C. B. G.; JÚNIOR, W. P. O.; PIMENTA, R. S. **Evaluation of the antiplasmodial and leishmanicidal potential of *Myrciaria dubia* (Myrtaceae) extract.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 49, n. 5, p. 586-592, out. 2016.
- DA SILVA L.L., PORTES J. DE A., DE ARAÚJO M.H., SILVA J.L., RENNÓ M.N., NETTO C.D., DA SILVA A.J., COSTA P.R., DE SOUZA W., SEABRA S.H., DAMATTA R.A. **Further evidence that naphthoquinone inhibits *Toxoplasma gondii* growth in vitro.** Parasitol Int. 2015 Dez;64(6):622-31. doi: 10.1016/j.parint.2015.08.010. Epub 2015 Set 1.
- DE SOUZA, W.; DUARTE, E.S.M.; URBINA, J.A.;VOMMARO, R. C. **Antiproliferative activities of two novel quinuclidine inhibitors against *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.58, p.59–65, 2006.
- DIETRICH, C. P.; FARIAS, G. G. M.; ABREU, L. R. D.; LEITE, E. L.; SILVA, L. F.; NADER H. B. **A new approach for characterization of polysaccharides from**

- algae: Presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class *Phaeophyceae*.** Plant. Sci., v.108, p.143-153, 1995.
- DINIZ E.M DE A; VAZ F.A.C. **Qual é a recomendação atual para o tratamento da toxoplasmose congênita?** Rev. Assoc. Med. Bras., v.49, n.1, 2003.
- DINIZ, J. A. ***Siparuna guianensis* Aublet como nova fonte de  $\alpha$ -bisabolol para o controle de *Rhipicephalus microplus*.** Viçosa, 2014. 82 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa.
- DOUG HENRY; JOHN H. BLOCK; JOHN L. ANDERSON; GARNET R. CARLSON. **Use of high-pressure liquid chromatography for quantitative structure-activity relationship studies of sulfonamides and barbiturates.** *J. Med. Chem.*, v. 19, p. 619–626, 1976.
- 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, p.267–299, 1998.
- DÜRIG, J.; BRUHN, T.; ZURBORN, K.; GUTENSOHN, K.; BRUHN, H. D.; LÁSZLÓ B. **Anticoagulant Fucoidan fractions from *Fucus vesiculosus* induce platelet activation in vitro.** Thrombosis Research, v.85, p.479-491, 1997.
- GAJI R.Y.; BEHNKE M.S.; LEHMANN M.M.; WHITE M.W.; CARRUTHERS V.B.; **Cell cycle-dependent, intercellular transmission of *Toxoplasma gondii* is accompanied by marked changes in parasite gene expression.** Mol. Microbiol, v. 79, Issue 1, p. 192–204, 2011.
- GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T; OGAWA, L; OLIVEIRA, R.C. **Soroprevalência do *toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e equinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do paraná-brasil.** Cienc. Rural, v. 29, n.1, p. 91-97, 1999.
- GRANCINI, F.; MOTTA, G.; CARNELLI, V.; SCHWARTZ, P.J.T. **Interval prolongation and risk of life-threatening arrhythmias during toxoplasmosis prophylaxis with spiramycin in neonates.** Am. Heart.J. v.133, p.108-111, 1997.
- HAROUN-BOUHEDJA, F.; MOSTAFA, E.; SINQUIN, C; BOISSON-VIDAL, C. **Relation between sulfate groups and biological activities of fucans.** Thromb.Res., v.100, p.453-459, 2000.
- HUGO A.O.R.; EDUARDO H.C.F; LUANA C.L.M.; IVAN R.L.A; VALQUÍRIA P. M; KARLA C.S.Q; EDDA L.L. **Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante.** Infarma, v.16, n. 1-2, p. 82-87, 2001.

- JOINER, K.A. & DUBREMETZ, J.F. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. *Infect. Immun.*, v.61, p.1169-1172, 1993.
- JOZEFONVICZ J. **Biological activities of polysaccharides from marine algae.** *Drugs of the Future*, v.20, p.1237-1249, 1995.
- LANE, A.L.; STOUT, E.P.; LIN, A.S.; PRUDHOMME, J.; LE ROCH, K.; FAIRCHILD, C.R.; FRANZBLAU, S.G.; HAY, M.E.; AALBERSBERG, W.; KUBANEK, J. **Antimalarial bromophycolides J-Q from the Fijian red alga *Callophycus serratus*.** *J Org Chem.* 2009 Apr 3;74(7):2736-42. doi: 10.1021/jo900008w.
- LYONS R.E. JOHNSON A.M. **Heat shock proteins of *Toxoplasma gondii*.** *Parasite Immunology*, v.17, Issue 7, p. 353-359, 1995.
- MACRE, M. S. **Avaliação da Quantificação da aivez de anticorpos maternos na abordagem laboratorial da Toxoplasmose congênita. 2002.** 112p. Dissertação (Mestre em Ciências) – Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- METSIS, A.; PETTSERSEN, E. ***Toxoplasma gondii*: characterization of a monoclonal antibody recognizing antigens of 36 and 38 Kda with acid phosphatase activity located in dense granules and rhoptries.** *Experimental Parasitology*, v. 81, p. 472-479, 1995.
- MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, P.O. **Toxoplasmosis.** *Lancet*; 363, p. 1965-1976, 2004.
- MORSE, L. M.; ANDERSON, I. S. **The influence of solvent on the teratogenic effect of folic acid antagonist in the rat.** *Experimental and Molecular Pathology*, v. 5, Issue 2, p. 134-145, 1996.
- VICENTE AMATO NETO, M. V. **Tratamento da toxoplasmose.** *Rev. Med.* v. 64, n. 1, p. 8-9, 1982.
- O'NEIL, M.J. **The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals.** Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., p. 1374, 2006.
- ORHAN, I.; SENER, B.; ATICI, T.; BRUN, R.; PEROZZO, R.; TASDEMIR, D. **Turkish freshwater and marine macrophyte extracts show in vitro antiprotozoal activity and inhibit FabI, a key enzyme of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis.** *Phytomedicine*. 2006 Jun;13(6):388-93. Epub 2006 May 11.
- PORTES J. A., MOTTA C.S., AZEREDO N.F., FERNANDES C., HORN A J.R., DE SOUZA W., DAMATTA R.A., SEABRA S.H. **In vitro treatment of *Toxoplasma***

- gondii with copper (II) complexes induces apoptosis-like and cellular division alterations.** *Vet Parasitol.* 2017 Out 15;245:141-152. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.04.002. Epub 2017 Abr 20.
- PORTES J.A., AZEREDO N.F.B., SIQUEIRA P.G.T., DE SOUZA T.G., FERNANDES C., HORN A J.R., CANDELA D.R.S., DE SOUZAW., DAMATTA R.A., SEABRA S.H. **A new iron (III) complex-containing sulfadiazine inhibits the proliferation and induces cystogenesis of *Toxoplasma gondii*.** *Parasitol Res.* 2018 Set;117(9):2795-2805. doi: 10.1007/s00436-018-5967-7. Epub 2018 Jun 22.
- REMINGTON, J. S.; McLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G In: **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant.** 5 ed. Cap. 5: Toxoplasmosis, p. 205-345, 2001.
- RODRIGUES, J.A.G; TORRES, V.M; ALENCAR, D.B; SAMPAIO, H.A; FARIAS W.L.R. **Extraction and anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from the red marine seaweed *Halymenia pseudofloresia*.** *Revista Ciência Agronômica*, v. 40, n. 2, p.224-231, 2009.
- SANTOS, J.M., LEBRUN, M., DAHER, W., SOLDATI, D., DUBREMETZ, J.F. **Apicomplexan cytoskeleton and motors: key regulators in morphogenesis, cell division, transport and motility.** *Int. J. Parasitol.* p. 153-162, 2009.
- SCHIRATO, G.V. et al. **Application of the polysaccharide from cashew gum in the rehabilitation of experimental cutaneous lesions in mice.** In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA MOLECULAR, 32., 2003, Caxambu, Minas Gerais. Anais... São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003. p. 100
- SIBLEY, L.D., KHAN, A., AJIOKA, J.W. AND ROSENTHAL.B.M. **Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans.** *Phil. Trans. R. Soc. B.* (2010), p. 2749-2761.
- SIBLEY. L.D.; ***Toxoplasma gondii*: Perfecting an intracellular lifestyle.** *Traffic*, p. 581-586, 2003.
- SOUZA W.; DUARTE, E. S. M.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R.C. **Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*.** *ScientiaMedica*, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.
- SOUZA, L. V. **Avaliação *in vitro* da atividade anti-*Toxoplasma gondii* do extrato etanólico e óleo essencial extraídos da *Siparuna guianensis* e do alfa bisabolol**

- isolado.** 2018. 83f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em ciências aplicadas à saúde regional Jataí) Departamento de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Goiás.
- SOUZA, M. L. S.; **Structural composition and anticoagulant activity of dermatan sulfate from the skin of the electric eel, *Electrophorus electricus* (L). Comparative Biochemistry and Physiology.**Biochemistry and Molecular Biology, v. 147, n. 03, p. 387-394, 2007.
- SOUZA, Wanderley et al. **Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*.** *Scientia Medica*, v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.
- SPÓSITO FILHA E.; OLIVEIRA S.M. **Divulgação técnica toxoplasmose.** Toxoplasmose. *Biológico*, São Paulo, v.71, n.1, p.13-15, 2009.
- STRAMBA-BADIALE, M.; NADOR, F.; PORTA, N.; GUFFANTI, S.; FREDIANI, M.; COLNAGHI, C.; GRANCINI, F.; MOTTA, G.; CARNELLI, V.; SCHWARTZ, P.J.T. **Interval prolongation and risk of life-threatening arrhythmias during toxoplasmosis prophylaxis with spiramycin m neonates.** *Am. Heart. J.* v.133, p.108-111, 1997.
- ZHANG W.; HALONEN S.K.; WITTNER M.; WEISS L.M.; **Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein,** *Infect. Immun.* 69 (2001) 501–507.