



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LAÍS FERNANDA MACHADO

NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE PRATA:
AÇÃO CONTRA FORMAS TAQUIZOÍTAS DA CEPA RH DE
Toxoplasma gondii EM CÉLULAS HeLa

LAÍS FERNANDA MACHADO

NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE PRATA:
AÇÃO CONTRA FORMAS TAQUIZOÍTAS DA CEPA RH DE
Toxoplasma gondii EM CÉLULAS HeLa

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Idessania Nazareth Costa

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Machado, Laís Fernanda.

Nanopartículas biogênicas de prata: ação contra formas taquizoítas da cepa RH de *Toxoplasma gondii* em células HeLa / Laís Fernanda Machado. - Londrina, 2019.
77 f. : il.

Orientador: Idessania Nazareth Costa.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Toxoplasmose - Tese. 2. Nanopartículas de Prata - Tese. 3. Tratamento alternativo - Tese. 4. Células HeLa - Tese. I. Nazareth Costa, Idessania. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

LAÍS FERNANDA MACHADO

NANOPARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE PRATA:
AÇÃO CONTRA FORMAS TAQUIZOÍTAS DA CEPA RH DE
Toxoplasma gondii EM CÉLULAS HeLa

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Idessania Nazareth
Costa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Francisco José de Abreu Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 20 de Março de 2019.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo da minha vida e, não somente nestes anos como pós graduanda, mas que em todos os momentos é o maior mentor que alguém pode conhecer.

À minha família, especialmente à minha mãe Maria Cleonice Frederico, meu pai Miguel Alves Machado, minha irmã Giovana Larissa Machado e minha prima Rebeka Diniz Alves Machado que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo superior, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Idessania Nazareth Costa, que oportunizou a abertura da janela que hoje vislumbro um horizonte superior, pela acendrada confiança e orientação neste trabalho. Em especial, às suas críticas construtivas e discussões que foram fundamentais ao longo de todo o percurso. Assim como a amizade construída durante todo o processo do trabalho.

À Prof^a Dr^a Milena Menegazzo Miranda Sapla, Prof^a Dr^a Ivete Conchon-Costa e Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli por todo o apreço e consideração durante todo o desenvolvimento do trabalho. Ao Prof. Dr. Juliano Bordignon, Prof^a. Dr^a. Pryscilla Fanini Wowk e doutorando Allan Henrique Depieri Cataneo por contribuir com a dosagem de citocinas e caracterização das nanopartículas; assim como aos amigos do laboratório, em especial à Larissa Rodrigues Bosqui e Raquel Arruda da Silva Sanfelice que sempre contribuíram para a realização deste estudo.

Aos amigos conquistados em eventos dentro e fora da universidade ao longo deste tempo, pelo encorajamento, paciência e apoio constante nas grandes e pequenas coisas. Agradecimento especial à Thais Peron, Rodolfo Sanches, Juliana Souza e Vinícius Ferreira, irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida.

À todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

“Nunca existiu uma grande inteligência sem uma veia de loucura.”

Aristóteles

“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis, é preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços.”

Albert Einstein

MACHADO, Laís Fernanda. **Nanopartículas biogênicas de prata: ação contra formas taquizoítas da cepa RH de *Toxoplasma gondii* em células HeLa.** 2019. 78 f. Dissertação de mestrado em Patologia Experimental. Universidade Estadual de Londrina – Londrina, 2019.

RESUMO

Devido à dificuldade no tratamento da toxoplasmose e toxicidade apresentada pelos fármacos convencionais (sulfadiazina e pirimetamina), como supressão de atividade da medula óssea e interação indistinta com os processos bioquímicos tanto do parasito quanto do hospedeiro, outros compostos vêm sendo pesquisados como tratamento alternativo para esta infecção. Neste contexto, nanomateriais vem demonstrando sucesso como ferramenta alternativa no tratamento de infecções, com destaque neste âmbito às nanopartículas biogênicas de prata (AgNp-Bio) que, de forma geral, apresentam baixa toxicidade (dependente do tamanho e concentração utilizada). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação das AgNp-Bio em células HeLa frente à infecção pela cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Primeiramente, foi realizado teste de viabilidade celular através de MTT e caracterização das AgNp-bio para verificar seu tamanho médio. Em seguida, foi realizada a infecção experimental, com células HeLa (1×10^5) infectadas por taquizoítas de *T. gondii* (5×10^5) e tratadas com AgNp-Bio ou tratamento convencional. Posteriormente, foi determinado o nível de citocinas padrão Th1 e Th2 no sobrenadante de células infectadas, assim como a quantidade de Óxido Nítrico (NO) e Espécies Reativas de Oxigênio (ROS). Os resultados demonstram que AgNp-Bio apresentou tamanho médio de 69nm de diâmetro e obteve toxicidade dose dependente, mantendo as células viáveis nas concentrações de 3 e 6 μM . Além disso, AgNp-Bio nas concentrações de 3 e 6 μM promoveram redução da adesão dos parasitos (51% e 56%), redução no índice de células infectadas (78% e 90%) e inibição da proliferação intracelular de taquizoítas (82% e 94%), respectivamente. Também foi observada tanto uma modulação da resposta inflamatória (com redução de IL-8) quanto baixa produção de NO e ROS, sugerindo ação direta das AgNp-Bio sobre o parasito. Diante desses apontamentos, este foi um trabalho pioneiro que destacou a ação anti-*T. gondii* das nanopartículas de prata sintetizadas de forma biogênica. Assim, segundo nossos resultados, além de imunomodular IL-8, essas nanopartículas demonstraram ter a capacidade de reduzir a proliferação do parasito sem a produção de ROS e NO. Dessa forma, esses resultados somam-se ao crescente número de pesquisas que apoiam a necessidade de explorar o potencial de AgNp-Bio dentro da esfera nanomédica e em estudos com *T. gondii*, uma vez que apresentam resultados promissores como alternativa terapêutica na toxoplasmose.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata. Toxoplasmose. Células HeLa.

MACHADO, Laís Fernanda. **Silver biogenic nanoparticles:** action against tachyzoite forms of the *Toxoplasma gondii* RH strain in HeLa cells. 2019. 78 p. Master's Dissertation in Experimental Pathology. State University of Londrina - Londrina, 2019.

ABSTRACT

Due to the difficulty in treating toxoplasmosis and the toxicity of conventional drugs (sulfadiazine and pyrimethamine), such as suppression of bone marrow activity and indistinct interaction with the biochemical processes of both parasite and host, other compounds have been investigated as an alternative treatment for this infection. In this context, nanomaterials have demonstrated success as an alternative tool in the treatment of infections, with emphasis in this field on the biogenic silver nanoparticles (AgNp-Bio), which generally present low toxicity (depending on the size and concentration used). In view of this, the objective of this work was to evaluate the action of AgNp-Bio in HeLa cells against infection by *Toxoplasma gondii* RH strain. First, cell viability testing by MTT and characterization of AgNp-bio were performed to verify their toxicity and mean size. Then, the experimental infection was performed with HeLa cells (1×10^5) infected with *T. gondii* tachyzoites (5×10^5) and treated with AgNp-Bio or conventional treatment. Subsequently, the amount of Nitric Oxide (NO) and Reactive Oxygen Species (ROS) was determined, as well as the level of Th1 and Th2 standard cytokines in the supernatant of infected cells. The results demonstrate that AgNp-Bio had a mean size of 69nm in diameter and obtained dose-dependent toxicity, keeping cells viable at concentrations of 3 and 6 μM . In addition, AgNp-Bio at concentrations of 3 and 6 μM promoted reduction of parasite adhesion (51% and 56%), reduction in infected cell index (78% and 90%) and inhibition of intracellular proliferation of tachyzoites (82% and 94%), respectively. Both modulation of the inflammatory response (with IL-8 reduction) and low NO and ROS production were observed, suggesting direct action of AgNp-Bio on the parasite. Faced with these notes, this was a pioneering work that highlighted the anti-*T. gondii* action of the silver nanoparticles synthesized in a biogenic way. Thus, according to our results, in addition to immunomodulating IL-8, these nanoparticles have been shown to have the ability to reduce parasite proliferation without the production of ROS and NO. Thus, these results are in addition to the growing number of studies that support the need to explore the potential of AgNp-Bio within the nanomedical sphere and in studies with *T. gondii*, since they present promising results as a therapeutic alternative in toxoplasmosis.

Keywords: Silver nanoparticles. Toxoplasmosis. HeLa cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Morfologia geral de <i>Toxoplasma gondii</i>	13
Figura 2 –	Formas evolutivas de <i>Toxoplasma gondii</i>	14
Figura 3 –	Ciclo de <i>Toxoplasma gondii</i>	16
Figura 4 –	Resposta imune contra <i>Toxoplasma gondii</i>	19
Figura 5 –	Mecanismo de ação da sulfadiazina e pirimetamina	23

LISTA DE ABREVIÇÕES

AgNp	Nanopartículas de prata
AgNp-Bio	Nanopartículas biogênicas de prata
APC	Células apresentadoras de antígenos
ATP	Adenosina trifosfato
BLP-NC	Nanocápsulas de lactoferrina bovina
CBA	<i>Citometric Bead Array</i>
DHFR	Dihidrofolato redutase
DHPS	Dihidropteroato sintase
DMEN	<i>Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimetil Formamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio de imun absorção enzimática
GRAs	Proteínas dos grânulos densos
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LMEN	Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise
MHC	Meio completo para HeLa
MIC-2	Proteína de Micronema tipo 2
MIF	Fator de Inibição de migração de macrófagos
MTT	3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio; azul de tiazolilo
NaNO ₂	Nitrito de sódio
AgNO ₃	Nitrato de prata
NF-KB	Fator nuclear Kappa B
NK	Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
NTA	Análise de rastreamento de nanopartículas
PBS	Tampão fosfato salino
PCR-RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase associado com o Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por Enzimas de Restrição
ROPs	Roptrias

ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAGs	Antígenos de superfície
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Aspectos morfo-biológicos de <i>toxoplasma gondii</i>	11
1.2	Formas evolutivas e ciclo biológico de <i>t. Gondii</i>	13
1.3	Cepas de <i>Toxoplasma Gondii</i>	17
1.4	Resposta imune e diagnóstico da toxoplasmose.....	28
1.5	Terapêutica da toxoplasmose.....	23
1.6	Nanopartículas de prata	24
2	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos.....	28
3	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
4	ARTIGO CIENTÍFICO	42
5	CONCLUSÃO GERAL	75
	ANEXOS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Morfo-Biológicos de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório capaz de infectar e se replicar em qualquer célula nucleada de aves e mamíferos (CENCI-GOGA *et al.*, 2011; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). O parasito, pertencente ao filo Apicomplexa, no qual estão incluídos outros patógenos de importância médica, como o *Plasmodium* spp., agente causador da malária, e o *Cryptosporidium* spp., agente causador de diarreias graves (OLIVEIRA, 2007; SOUZA *et al.*, 2010). A toxoplasmose, infecção provocada por *T. gondii*, afeta cerca de um terço da população mundial, com taxas mais altas na América do Sul e Central e na Europa Continental (50-80%) (SAADATNIA; GOLKAR, 2012; NASR *et al.*, 2016).

O parasito possui uma forma alongada com as extremidades arqueadas, lembrando o formato de uma banana (REMINGTON *et al.*, 2016). Morfologicamente, *T. gondii* apresenta um apicoplasto, que é caracterizado como um plasto secundário não-fotossintético delimitado por cinco membranas (McFADDEN, 2011) mas também se assemelha às demais células eucarióticas, apresentando núcleo, mitocôndrias, complexo golgiense, lisossomos e retículo endoplasmático. Além disso, apresenta organelas características, especialmente envolvidas com os processos de adesão e invasão do parasito à célula hospedeira tais como micronemas, roptrias e grânulos densos (BLADER; SAEIJ, 2009; BOUCHUT *et al.*, 2014) (Figura 1).

A adesão de *T. gondii* à célula hospedeira é inicialmente mediada por proteínas de superfície do parasito, denominadas de antígenos de superfície (SAGs) (POLLARD *et al.*, 2008; BARRAGAN *et al.*, 2005). Após esse primeiro contato com a célula hospedeira, ocorre aumento dos níveis intracelulares de cálcio no parasito, que induzem a secreção de proteínas derivadas dos micronemas (BLADER; SAEIJ, 2009; HUNTER; SIBLEY, 2012). Atualmente se conhece 20 tipos dessas proteínas (ZHOU *et al.*, 2005; BLADER; SAEJI, 2009), sendo a proteína de micronema tipo 2 (MIC-2) a melhor estudada até o momento. Barragan, Brossier e Sibley (2005) demonstraram que a MIC-2 de *T. gondii* liga-se à molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) da célula hospedeira, permitindo ao parasito migrar até os

tecidos imunologicamente privilegiados, como cérebro, retina e placenta, utilizando-se de uma via paracelular. Esse tipo de deslocamento parasitário permite a invasão de novos tecidos e, conseqüentemente, a disseminação mais rápida do parasito no organismo hospedeiro (BARRAGAN; BROSSIER; SIBLEY, 2005; ROBERT-GANGNEUSE; DARDÉ, 2012).

Logo após a adesão de *T. gondii* na célula hospedeira, o parasito inicia um movimento específico e dependente de actina e miosina denominado *gliding*, fundamental para a entrada do parasito na célula (BLADER; SAEIJ, 2009). Posteriormente, ocorre a liberação de proteínas derivadas das roptrias (ROPs) atuando no transporte do parasito para o interior da célula hospedeira (STRAUB *et al.*, 2009). Dziadek, Dziadek e Dlugonska (2007) demonstraram um novo atributo das roptrias, ao relatar que ROP2 e ROP4 ligam-se à lactoferrina humana, como um fenômeno capaz de influenciar no processo de adesão do parasito à célula hospedeira e posterior replicação intracelular. Além disso, recentemente, ROP17 foi descrito por interagir com ROP5 e desempenharem a função de evasão do sistema imune (SHWAB *et al.*, 2016).

Os grânulos densos presentes na membrana do parasito são organelas que liberam seu conteúdo proteico dentro do vacúolo parasitóforo após a invasão (HAKIMI; OLIAS; SIBLEY, 2017). As proteínas dos grânulos densos (GRA-1 a GRA-9) possuem diferentes pesos moleculares e permanecem solúveis no lúmen do vacúolo parasitóforo ou associadas a ele, garantindo uma fonte de nutrição e impedindo a ligação de lisossomos ao vacúolo (CARRUTHERS, 2002). Estudos revelaram que *T. gondii* usa GRA-7 para redirecionar o transporte de nutrientes da célula hospedeira em direção ao lúmen do vacúolo parasitóforo (COPPENS *et al.*, 2006; DESHPANDE *et al.*, 2013). Este processo se dá pelo redirecionamento dos microtúbulos e filamentos intermediários da célula hospedeira, garantindo que as organelas do hospedeiro se concentrem nos arredores do vacúolo parasitóforo (BLADER; SAEIJ *et al.*, 2009; HAKIMI; OLIAS; SIBLEY, 2017).

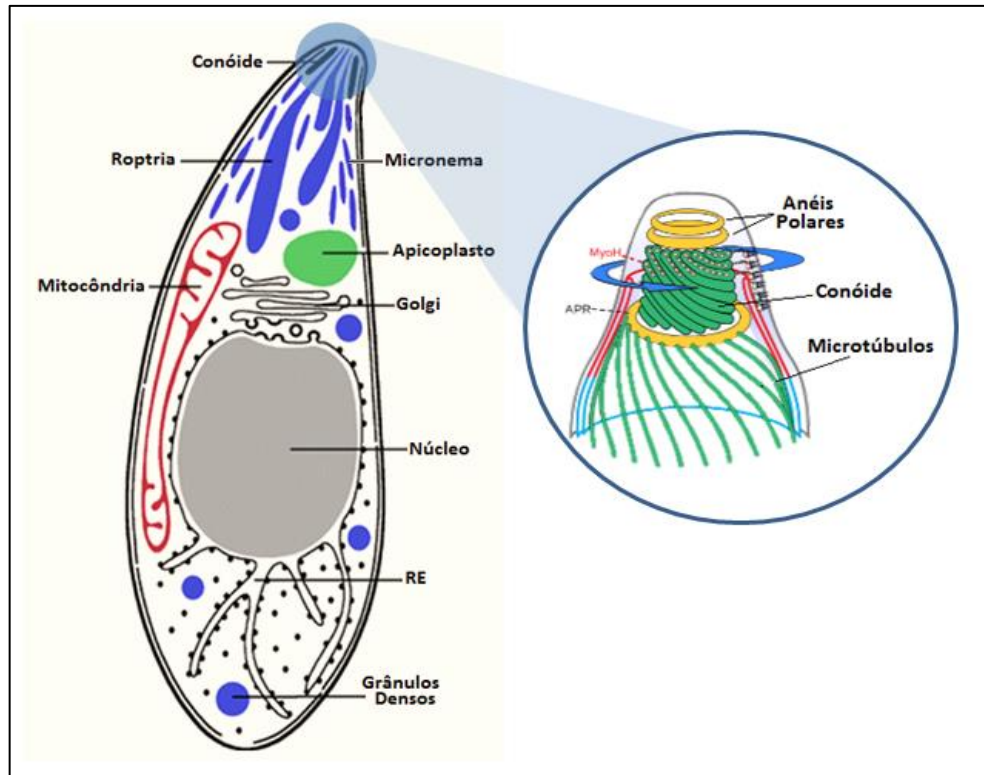


Figura1. Morfologia geral de *Toxoplasma gondii*. Fonte: Adaptado de Hartmann, 2016.

1.2 Formas evolutivas e ciclo biológico de *T. gondii*

T. gondii apresenta três estágios infectantes: taquizoítos invasivos que se dividem rapidamente, bradizoítas que se dividem lentamente nos cistos teciduais e esporozoítas, protegidos dentro de um oocisto (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Os taquizoítos são típicos da fase aguda da infecção e se multiplicam dentro dos vacúolos parasitóforos formando rosetas. Com a ruptura celular pelo intenso parasitismo, podem invadir outras células ou serem fagocitados (REMINGTON *et al.*, 2016). Os taquizoítos são vulneráveis aos fatores de defesa do hospedeiro produzidos pelo sistema imunológico e são estudados como alvos preferenciais para a escolha, ação e desenvolvimento de medicamentos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; SKARIAH; McINTYRE; MORDUE, 2010). Alguns taquizoítos, ao penetrarem nas células hospedeiras, proliferam lentamente, desenvolvendo um metabolismo mais lento, formando o cisto tecidual contendo bradizoítas que morfologicamente diferem pouco dos taquizoítos (NISHIKAWA *et al.*, 2011; SKARIAH; McINTYRE; MORDUE, 2010) (Figura 2).

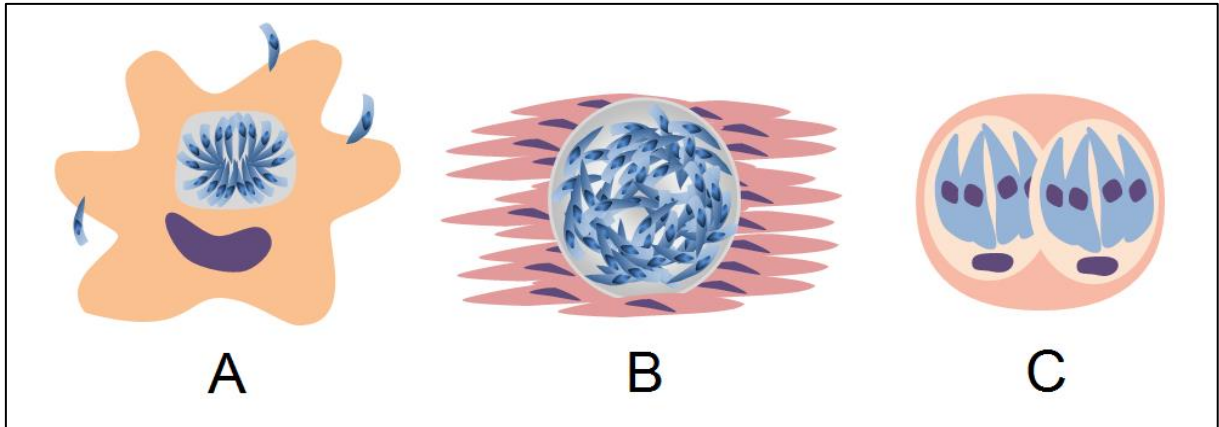


Figura 2. Formas evolutivas de *Toxoplasma gondii*: taquizoítas (A), bradizoítas (B) e oocisto contendo esporozoítas (C). Fonte: Autor próprio.

Oocisto é a forma de resistência encontrada no ambiente e, quando maduro, contém esporozoítas que tem potencial para contaminar água, solo e alimentos (AMENDOEIRA, 1995). Oocistos contendo esporozoítas representam um estágio parasitário altamente infeccioso. Estes são excretados nas fezes dos felinos após a reprodução sexuada que ocorre nos enterócitos desses animais (KASPER; BOOTHROYD, 1993) (Figura 2).

O ciclo biológico de *T. gondii* se processa em duas fases distintas: assexuada por endodiogenia e sexuada. Os felídeos dos gêneros *Felis* e *Lynx* são os hospedeiros definitivos porque além de apresentarem a etapa assexuada, também apresentam uma etapa sexuada do ciclo. Entretanto, outros animais, assim como demais mamíferos e aves, apresentam apenas o ciclo assexuado do parasito e são, portanto, considerados hospedeiros intermediários (DUBEY *et al.*, 2012; KRUEGER *et al.*, 2014).

A etapa sexuada do ciclo se inicia quando ocorre o rompimento da célula infectada com consequente liberação dos merozoítos. Estes penetram em outras células epiteliais e se diferenciam em formas sexuadas masculinas e femininas, que após a maturação formam os gametas femininos imóveis (macrogametas) e masculinos móveis (microgametas). Os microgametas saem das células e fecundam o macrogameta, presente em outras células. Depois da fertilização há formação de uma parede externa envolvendo o zigoto, dando origem ao oocisto imaturo que é liberado para o meio junto com as fezes dos felídeos. No ambiente com condições ideais de temperatura e umidade tornam-se infectantes

(DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; HUNTER; SIBLEY, 2012; SANTOS; GARCIA; SILVA, 2016).

Os hospedeiros intermediários, como o homem, adquirem a infecção pela ingestão de oocistos presentes em água e alimentos contaminados, por cistos teciduais presentes em carnes cruas e mal cozidas ou ingestão de taquizoítos que podem estar presentes em líquidos biológicos (saliva, leite, esperma); ou ainda, transplantes de órgãos e infecções transplacentárias (KODJIKIAN, 2010; CENCI-GOGA *et al.*, 2011; HUNTER; SIBLEY, 2012). Ocorrendo o contato com o parasito, este sofre intensa multiplicação e penetra em várias células do hospedeiro, local onde o parasito forma o vacúolo parasitóforo e se multiplica por endodiogenia formando novos taquizoítos. Estes rompem as células parasitadas e infectam outras células (HUNTER; SIBLEY, 2012) (Figura 3).

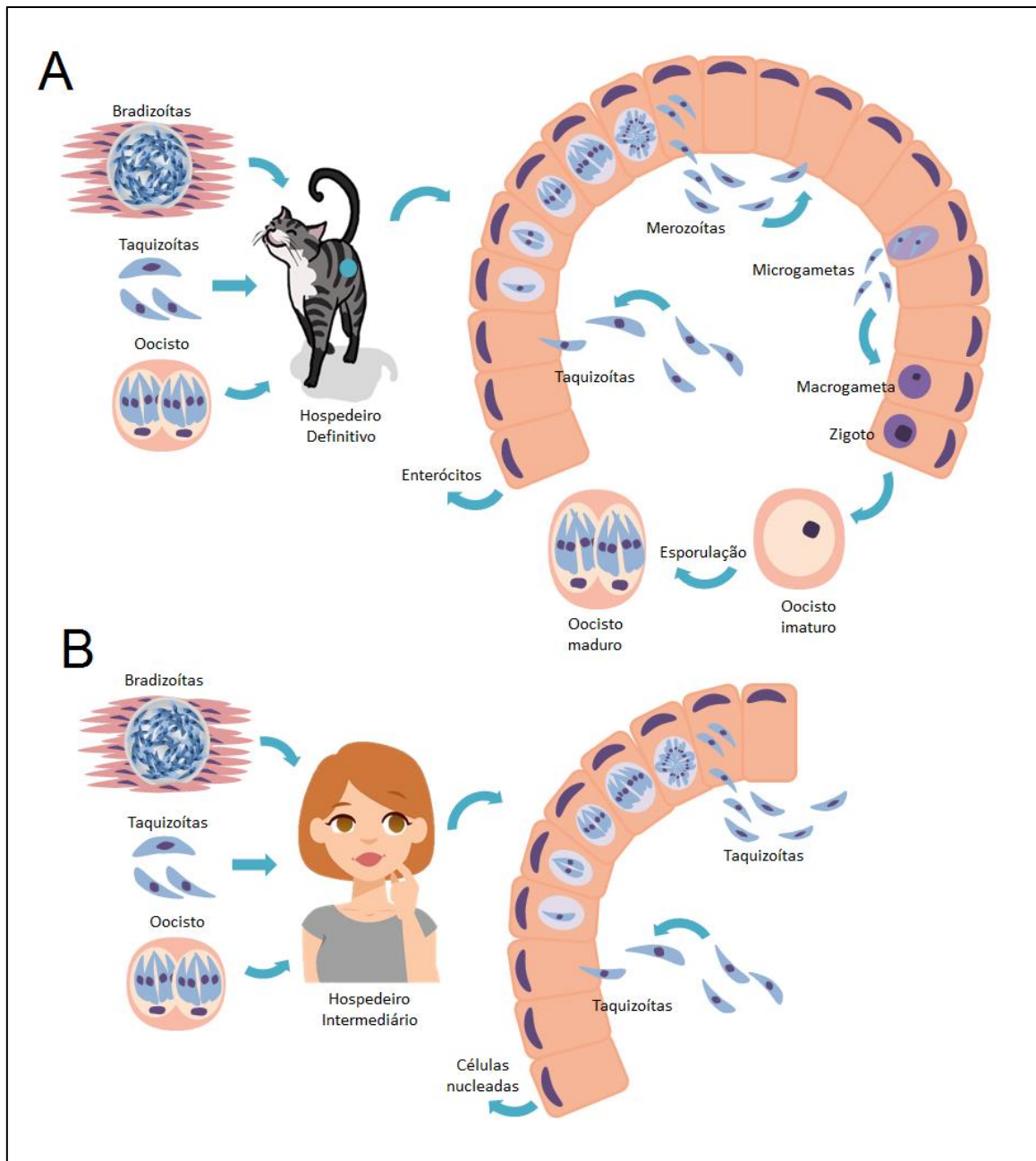


Figura 3. Ciclo de *Toxoplasma gondii* demonstrando infecção via taquizoítas, bradizoítas e oocistos maduros. A etapa sexuada (A) ocorre nas células epiteliais do intestino dos felinos, onde os taquizoítas se replicam por merogonia, liberando merozoítas. Os merozoítas invadem novas células e se diferenciam em microgametas e macrogametas, que se fundem para formar o zigoto, também chamado oocisto imaturo. Esse oocisto é liberado nas fezes do felino e, em boas condições ambientais, ele sofre esporulação e se torna infectante. A etapa assexuada (B) ocorre em aves e mamíferos, onde os taquizoítas infectam células nucleadas do hospedeiro e se replicam por endodiogenia. A célula se rompe, liberando novos taquizoítas que irão infectar outras células. Além disso, pode haver formação de cistos no hospedeiro, principalmente em tecido nervoso e ocular. Também pode ocorrer infecção congênita, que pode levar a um quadro clínico grave. Fonte: Autor próprio.

1.3 Cepas de *Toxoplasma gondii*

A infecção toxoplásmica em humanos apresenta-se, frequentemente, assintomática ou com sintomas inespecíficos; no entanto, pode tornar-se clinicamente evidente em indivíduos imunocomprometidos, podendo resultar principalmente em complicações neurológicas e oculares (BARBOSA, 2015; MACHALA *et al.*, 2015; KHAN; KHAN, 2018). Também é uma infecção importante em casos de transmissão placentária, que permite ao parasito provocar sérios efeitos deletérios no embrião ou feto, incluindo malformações bem como abortos, dependendo do período gestacional (OZ, 2014). Os fatores que controlam a patogenicidade de *T. gondii* estão relacionados à susceptibilidade genética do hospedeiro, ao seu estado nutricional e seu sistema imune, à carga parasitária e à virulência da cepa do parasita (PENA *et al.*, 2008; SIBLEY *et al.*, 2002; HOLLAND, 2004). Além disso, a toxoplasmose apresenta maior incidência em locais quentes, como áreas tropicais de baixas latitudes, e acredita-se que a amplitude geográfica e a grande biodiversidade da fauna do Brasil possam contribuir para uma maior variabilidade genética das cepas brasileiras de *T. gondii* e que influenciam diretamente na toxoplasmose (DARDÉ, 2008; KHAN *et al.*, 2011; GOODSON; DON WINSLOW, 2013).

As cepas de *T. gondii* estão amplamente distribuídas na natureza (DUBEY; SU, 2009). Análises moleculares mostram que a maioria das cepas apresenta um padrão genético clonal e são pertencentes a um dos três genótipos: tipo I, II e III (SAEIJ *et al.*, 2005; SIBLEY; AJIOKA, 2008; STUTZ *et al.*, 2012) as quais são principalmente encontradas na Europa, América do Norte e Ásia (SHWAB *et al.*, 2016).

As cepas do tipo I (RH, CAST e VEL) apresentam alta virulência em camundongos, sendo letal em doses mínimas e, normalmente, são associadas a casos de toxoplasmose aguda, apresentando capacidade reduzida de formar cistos em cultura de células ou em animais infectados (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; SAEIJ *et al.*, 2005; CARNEIRO, 2011; MONTAZERI *et al.*, 2017). Em humanos esta cepa causa doenças oculares graves (VALLOCHI *et al.*, 2005; COMMODARO *et al.*, 2009). Cepas do tipo II (ME49, WIL, HART) são cistogênicas e de virulência moderada (FLEGR *et al.*, 2014; SANTOS, 2015) e se relacionam aos casos de

reativação da infecção crônica em humanos e infecções congênitas (AJZENBERG; COGNE; PARIS, 2002; SIBLEY *et al.*, 2009). Cepas do tipo III (VEG e SOU) associam-se às infecções animais e são responsáveis por infecções brandas e assintomáticas (KIM; WEISS, 2004; SIBLEY *et al.*, 2009; STUTZ *et al.*, 2012; FLEGR *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, estudos sobre os polimorfismos genéticos e caracterização genotípica de isolados de *T. gondii* em amostras de diferentes espécies de animais e humanos de países distintos revelam a diversidade genética deste parasito (DUBEY *et al.*, 2007; PENA *et al.*, 2008; KHAN *et al.*, 2011; FRANCO *et al.*, 2015; HAKIMI; OLIAS; SIBLEY, 2017). Pela análise de PCR-RFLP do locus SAG2 – que codifica o antígeno de superfície p22 – os isolados encontrados na América do Norte e Europa apresentam alelos típicos das cepas tipo I, II e III, sendo que a cepa predominante é do tipo II (SIBLEY *et al.*, 2009). Porém, em isolados oriundos de outras regiões do mundo, além de Europa e Estados Unidos, observa-se alta porcentagem de genótipos atípicos ou recombinantes, sugerindo que a população de *T. gondii* seria altamente diversa nessas regiões (DUBEY *et al.*, 2007; SIBLEY; AJIOKA, 2008; FRANCO *et al.*, 2015; HAKIMI; OLIAS; SIBLEY, 2017). Estes resultados corroboram com a pesquisa de Dubey e colaboradores (2007), que demonstrou que as cepas de *T. gondii* do Brasil e Colômbia são biológica e geneticamente diferentes daquelas da América do Norte e Europa.

1.4 Resposta imune e diagnóstico da toxoplasmose

O controle da infecção por *T. gondii* ocorre principalmente pela imunidade celular, permitindo o controle da replicação do parasito pelo sistema imunológico (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; CORDEIRO *et al.*, 2010). Dessa forma, o processo inflamatório desencadeado pela infecção por *T. gondii* envolve a expressão de uma série de proteínas inflamatórias, incluindo citocinas e mediadores inflamatórios cuja expressão gênica de muitos destes elementos é controlada pelo fator nuclear kappa B (NF- κ B) (BLANCO *et al.*, 2003).

Na imunidade mediada por células, após a ingestão e penetração dos parasitos no epitélio intestinal, ocorre liberação de quimiocinas pelas células infectadas, levando à atração de células da imunidade inata, como neutrófilos e

outras células fagocíticas, as quais contribuem para redução da carga parasitária (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). A estimulação das células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos e células dendríticas, induzem a produção de citocinas, especialmente a interleucina-12 (IL-12), que por sua vez, estimula células Natural Killer (NK) a secretarem Interferon gama (IFN- γ), levando à polarização de linfócitos T CD4⁺ em Th1 (ALIBERTI, 2005; GAZZINELLI *et al.*, 2014; YAROVINSKY, 2014; BABAIE *et al.*, 2017; HU, 2017) (Figura 4).

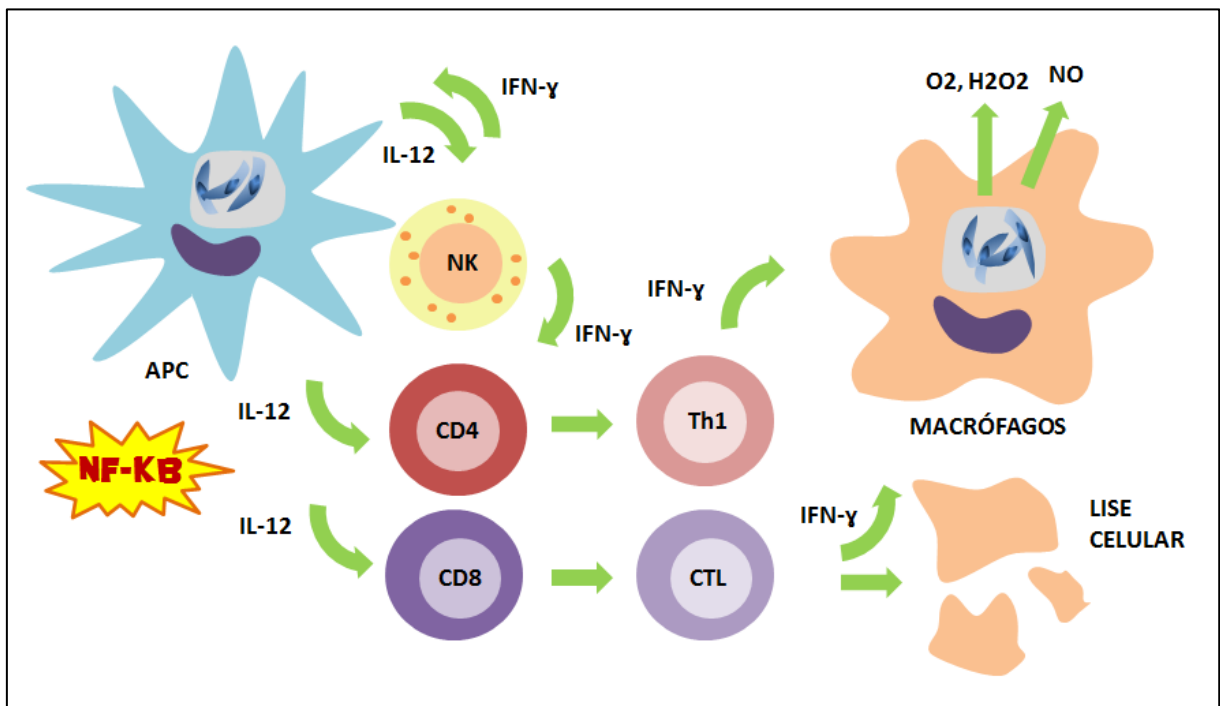


Figura 4. Resposta imune contra *Toxoplasma gondii*. Fonte: Autor próprio.

Uma das funções da citocina IFN- γ é atuar favorecendo a conversão de taquizoítos em bradizoítos, além de impedir a ruptura de cistos teciduais, e conseqüentemente inibe a reativação do parasito no hospedeiro (DENKERS *et al.*, 1998; WANG; KIKUCHI; SUZUKI, 2004). A ativação de macrófagos cerebrais por IFN- γ e TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa) consiste em um mecanismo de defesa do cérebro contra *T. gondii* (MILLER *et al.*, 2009; SILVA; LANGONI, 2009; MUNOZ *et al.*, 2011; FOX *et al.*, 2016). Além disso, IFN- γ é um potente ativador de macrófagos, estimulando a produção de óxido nítrico (NO) – importante em diversos papéis fisiológicos e respostas inflamatórias – permitindo ação tóxica contra o parasito (MILLER *et al.*, 2009; PIFER; YAROVINSKY, 2011; HU, 2017). Assim, em infecções por *T. gondii*, o NO pode matar diretamente as formas

taquizoítas inibindo enzimas mitocondriais e nucleares (BRUNET, 2001). Contudo, essa produção de NO pode ser prejudicial para o hospedeiro, contribuindo com o aumento da patogenia induzida por citocinas inflamatórias (MILLER *et al.*, 2009). Dessa maneira, mecanismos imunomoduladores atuam para o equilíbrio entre respostas T_h1 e T_h2 , sendo mediada especialmente pela IL-10, que controla a infecção (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Normalmente, o padrão de resposta frente à *T. gondii* é pró-inflamatório do tipo T_h1 , como citado anteriormente. Entretanto, além de T_h1 , a subpopulação de linfócitos T_h17 – secretor de IL-17 – também demonstrou ser importante na resposta à infecção por *T. gondii*. IL-17 é a principal citocina responsável pelo recrutamento e desenvolvimento de neutrófilos, os quais eliminam grande quantidade de parasitos durante as fases iniciais de infecção (KELLY *et al.*, 2005; GUITON *et al.*, 2010). IL-17 também estimula a produção de IL-6 que em associação com NO, amplifica a resposta inflamatória local em sinergia com outros mediadores (AFZALI *et al.*, 2007).

Outra citocina importante na resposta imunológica contra a infecção por *T. gondii* é a IL-2, que auxilia no recrutamento de novos linfócitos $CD4^+$, promovendo a ativação de células $CD8^+$ que secretam enzimas proteolíticas capazes de romper a membrana de parasitos livres ou células infectadas pelo mesmo (SUBAUSTE; KONIARIS; REMINGTON, 1991; FOX *et al.*, 2016).

Além dos mediadores citados, outras substâncias atuantes na resposta imune celular, como o MIF (Fator de Inibição de Migração de Macrófagos), exercem papel na resistência do hospedeiro à infecção pelo parasito, sendo que esta citocina participa da maturação de células dendríticas e atua na produção de IL-1 β , IL-12 e TNF, em camundongos infectados com *T. gondii* (TERRAZAS *et al.*, 2010). IL-6, por sua vez, mostrou-se mediador de produção elevada de monócitos humanos, quando estes foram estimulados com soros positivos para a infecção, contendo IgG anti-*T. gondii* (PELLOUX *et al.*, 1994). Além disso, IL-8, enquanto quimiocina reguladora do recrutamento de neutrófilos, monócitos e linfócitos aos sítios inflamatórios, teve sua produção

aumentada, através do NF- κ B, em células epiteliais uterinas humanas (HeLa), sugerindo também sua contribuição na patogênese da infecção (KIM *et al.*, 2001).

A resposta imune humoral contra *T. gondii* também participa no controle da infecção. A estimulação da produção de anticorpos específicos é feita a partir da ativação de linfócitos B humanos por células T CD4⁺, havendo produção de cinco classes de imunoglobulinas: IgA, IgM, IgG, IgE e IgD. A classe de anticorpos IgM é típica da fase aguda, sendo a primeira que aparece no início da infecção e permanecendo detectáveis no soro humano por anos (TAKAHASHI; ROSSI, 1997; MITSUKA-BREGANÓ; LOPIS-MORI; NAVARRO, 2010) enquanto que a classe IgG é característica da fase crônica da toxoplasmose. A detecção desses diferentes perfis de anticorpos é importante para o seu diagnóstico. Algumas subclasses de IgG apresentam atividade no combate ao parasito através da ativação do sistema complemento, sendo que anticorpos IgG1 são mais predominantes, enquanto que IgG2 e IgG3 exibem menores quantidades (SANTANA, 2011). Os anticorpos podem exercer seus efeitos de diversas formas: impedem a ligação do parasito aos receptores celulares; opsonização do parasito, facilitando sua fagocitose por células fagocitárias; ou através da ativação da via clássica do sistema complemento (DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012).

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser clínico ou laboratorial. O diagnóstico clínico é complexo, visto que, os casos agudos apresentam sintomas inespecíficos, podendo se assemelhar a outras doenças ou até mesmo ser assintomático. Sendo assim, a suspeita clínica deverá ser confirmada por meio de diagnóstico laboratorial, que é mais frequente por meio de testes sorológicos que indicam a presença de anticorpos circulantes caracterizando a fase da infecção (GOODSON; DON WINSLOW, 2013). Entretanto, estes testes podem ter problemas de sensibilidade e especificidade, gerando resultados falso-positivos ou falso-negativos (ZHANG *et al.*, 2016).

O teste mais utilizado é o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), que permite desde uma simples triagem inicial da toxoplasmose até a determinação da fase de infecção com alta eficiência (GOODSON; DON WINSLOW 2013; EMELIA *et al.*, 2014). Vale ressaltar a importância do ELISA-avidez no diagnóstico. O teste de avidez de anticorpos IgG analisa a força de

ligação do complexo formado antígeno-anticorpo. Na fase aguda da doença, uma vez que a síntese de anticorpos é recente, a ligação do complexo antígeno-anticorpo é facilmente dissociável, concluindo que a IgG tem reduzida avidéz pelo antígeno. Contudo, na fase crônica, formam-se complexos antígeno-anticorpo de difícil dissociação, representando resultado com IgG de elevada avidéz (LEÃO; MEIRELES-FILHO; MEDEIROS, 2004; TANIMURA *et al.*, 2015).

Existe a necessidade de estimar o tempo de ocorrência da infecção, no caso de mulheres grávidas que têm IgM e provável infecção aguda, o teste de avidéz de IgG é aconselhável. A infecção é considerada recente (três meses ou menos) quando a porcentagem de anticorpos IgG com baixa avidéz for <30% e correlacionada com o aumento do risco da infecção fetal. O diagnóstico em recém-nascidos é realizado através da detecção de IgG e/ou IgA e/ou presença de IgG em níveis crescentes ou positividade persistente em 12 meses da vida da criança. Anticorpos IgM não atravessam através da placenta e são considerados marcadores congênitos da infecção (GOODSON; DON WINSLOW, 2013).

Outro teste para o diagnóstico da toxoplasmose é a reação de imunofluorescência indireta, que é sensível e seguro, podendo ser usado tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença. (EMELIA *et al.*, 2014). Além disso, técnicas moleculares (reação em cadeia da polimerase, PCR tempo-real) apresentam-se como método mais sensível, e tem se mostrado útil em várias aplicações, incluindo a detecção de DNA do parasito, pois a amplificação dos ácidos nucleicos permite a detecção mínima da quantidade do DNA alvo mesmo na presença de altas concentrações do DNA do hospedeiro ou de outros organismos coinfectantes (FERRREIRA; ÁVILA, 2001). Para a toxoplasmose ocular, são pesquisados anticorpos no humor aquoso ou no vítreo, esses anticorpos podem ser detectados pelo teste *Immunoblot* com reatividade para bandas antigênicas diferentes do que para o soro e outra possibilidade de detecção de *Toxoplasma* intraocular seria pela identificação de DNA parasitário pela PCR (FERRREIRA; ÁVILA, 2001).

Devido à gravidade da toxoplasmose faz-se necessário a urgência no diagnóstico precoce para que se inicie o tratamento adequado.

1.5 Terapêutica da Toxoplasmose

O fármaco ideal para o tratamento da infecção por *T. gondii* deve apresentar propriedades parasiticidas contra os diferentes estágios do parasito, distribuição nos sítios principais de infecção fetal e total isenção de toxicidade fetal e de efeitos teratogênicos. No entanto, nenhuma droga atualmente utilizada no tratamento humano da toxoplasmose apresenta todos esses critérios (DEROUIN *et al.*, 2000; ELSHEIKHA, 2008; BARBOSA *et al.*, 2015).

O uso combinado de pirimetamina e sulfadiazina é aprovado como tratamento de escolha para a toxoplasmose desde 1950. Os fármacos atuam sinergicamente no bloqueio da via de síntese do folato por meio da inibição das enzimas dihidropteroato sintase (DHPS) e dihidrofolato redutase (DHFR) (figura 5), essenciais para a sobrevivência e replicação do parasito (ANDERSON, 2005). Entretanto, a sulfadiazina não é bem tolerada pelo organismo hospedeiro, apresentando efeitos adversos, principalmente supressão de atividade da medula óssea que pode ocasionar anemia megaloblástica, leucopenia e granulocitopenia (PETERSEN, 2007). E o uso da pirimetamina é pouco empregada na terapêutica por ser altamente tóxica, pois interage indistintamente com os processos bioquímicos tanto do parasito quanto do hospedeiro (SILVA, 1998; KATZUNG, 2006) (Figura 5).

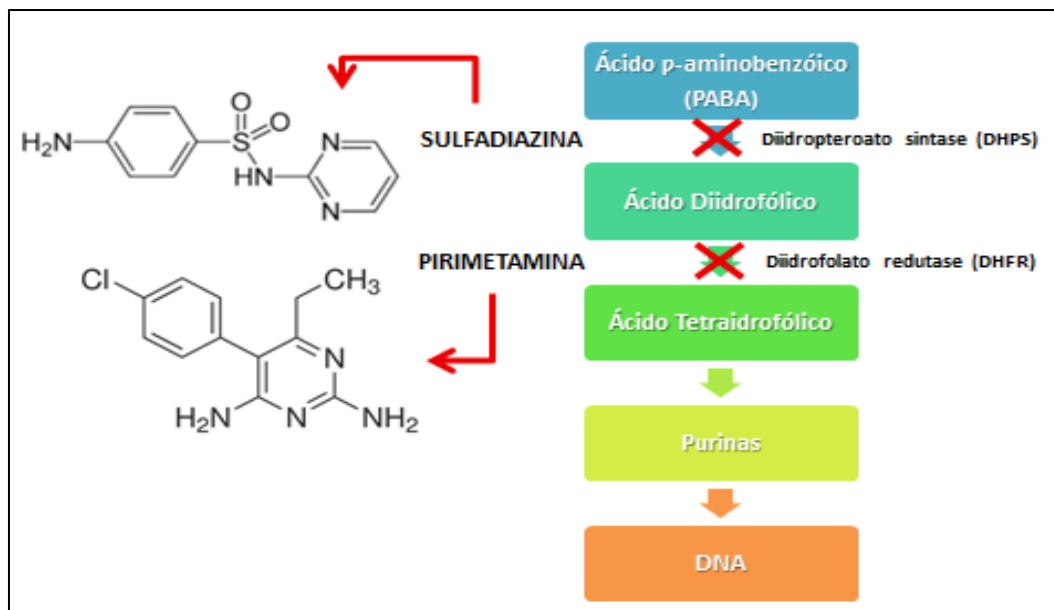


Figura 5. Mecanismo de ação da sulfadiazina e pirimetamina. Os fármacos agem no bloqueio da via de síntese do folato, inibindo as enzimas dihidropteroato sintase (DHPS) e dihidrofolato redutase (DHFR). Fonte: Autor próprio.

Em casos de infecção congênita, a espiramicina é usada isoladamente ou, dependendo da fase gestacional, associada à sulfadiazina e pirimetamina. A última combinação de tratamentos produz efeitos tóxicos, incluindo a supressão da medula óssea, que pode ser atenuada pelo uso adjuvante do ácido fólico (ANTCZAK; DZITKO; DŁUGOŃSKA, 2016). Além disso, nos casos de toxoplasmose ocular, a administração de um anti-inflamatório é necessária em adição ao tratamento convencional, diminuindo assim a disseminação de danos na retina (MORAIS *et al.*, 2016).

Devido à dificuldade no tratamento da toxoplasmose e toxicidade apresentada pelas drogas convencionais, outros compostos são pesquisados como tratamento alternativo para esta infecção. Nesse sentido, tem-se investigado avanços na nanomedicina, destacando-se o uso de nanomateriais, que são caracterizados por apresentarem tamanho menor que 1000nm, podendo ser de natureza metálica, lipídica ou polimérica (GUTIÉRREZ *et al.*, 2016; ASSOLINI *et al.*, 2017; TOMIOTTO-PELISSIER *et al.*, 2017). Alguns deles, principalmente os de origem metálica estão sendo utilizadas no tratamento de diversas infecções (SCANDORIEIRO, *et al.*, 2016) inclusive na toxoplasmose (GAAFAR, *et al.*, 2014). Neste sentido podem atuar como carreadores de fármacos, reduzindo a toxicidade, modulam a farmacocinética, aumentam a biodisponibilidade, bem como a liberação direcionada do fármaco no alvo específico (KHALIL, *et al.*, 2013; TORRES-SANGIAO *et al.*, 2016).

1.6 Nanopartículas de Prata

Entre os nanomateriais de origem metálica, destacam-se as nanopartículas. Estas são baseadas em pequenos agregados bem definidos de metais nobres no estado de valência zero (TOMIOTTO-PELISSIER *et al.*, 2017). Entre elas temos as nanopartículas de prata (AgNp) que apresenta atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (EDMUNDSON; CAPENESS; HORSFALL, 2014). A nanopartícula de prata pode ser produzida por métodos químicos, físicos e biológicos (DURÀN *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2011). O processo para selecionar cepas com potencial químico para transformar os íons de prata (ganho de elétrons) em prata metálica, resultando na formação das nanopartículas, foi descrito por Rodrigues e colaboradores (2012), onde enzimas presentes no fungo *Fusarium*

oxysporum, como a nitrato redutase, são responsáveis por essa transformação química. No método biológico o fungo *Fusarium oxysporum* deixa uma parte de suas proteínas sobre a superfície das nanopartículas, o que lhes confere características diferenciadas. Dentre as diversas características das nanopartículas, um fator importante a ser levado em consideração é o tamanho que elas apresentam devido à importância das propriedades físico-químicas, seus efeitos biológicos e atividade antimicrobiana (ADAIR, 2009; GAUMET; GURNY; DELIE, 2009). As atividades antimicrobianas das nanopartículas de prata podem ser controladas pela modificação do seu tamanho, obtendo uma ação potencializada conforme a redução do diâmetro desta nanopartícula (SHAMELI *et al.*, 2012).

O sucesso do emprego da nanotecnologia envolve estratégias possivelmente capazes de associar vantagens terapêuticas uma vez que promovem a vetorização de medicamentos já utilizados na área farmacêutica, também por apresentarem a capacidade de compartimentalizar, de maneira eficiente, diversos grupos de agentes terapêuticos e de modificar as propriedades e o comportamento de substâncias ativas em meio biológico. Embora o mecanismo antimicrobiano das nanopartículas de prata necessite de melhores esclarecimentos, sabe-se que elas têm a capacidade de serem depositadas no interior das mitocôndrias e prejudicar a via de estresse oxidativo (ASHARANI *et al.*, 2009; NEL *et al.*, 2006). Assim, a síntese de adenosina trifosfato (ATP) é inibida quando as proteínas mitocondriais são danificadas (ZHENG *et al.*, 2008). Ainda, podem prejudicar as glicoproteínas antimicrobianas e moléculas de lipofosfoliglicano, que são responsáveis pela infectividade de bactérias e parasitos (ARVIZO *et al.*, 2010). Além disso, outro mecanismo é a liberação de íons que interferem com a cadeia respiratória nas mitocôndrias resultando em morte celular (SONG *et al.*, 2006; WONG; LIU, 2010; DURÁN *et al.*, 2016). Não obstante, são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) sob luz ultravioleta, levando à morte de agentes microbianos (LODGE; DESCOTEAUX, 2006; KORA; SASHIDHAR, 2015), inclusive de ação contra fungos (SANGUINÉDO *et al.*, 2018) e alguns tipos de vírus (LARA *et al.*, 2010; GAIKWAD *et al.*, 2013). Da mesma forma, AgNp tem apresentado uma forte atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SHRIVASTAVA *et al.*, 2007; SCANDORIEIRO

et al., 2016; DURÁN *et al.*, 2016), além da ação antileishmanicida (ALLAHVERDIYEV *et al.*, 2011; FANTI *et al.*, 2018), redução de oocistos de *Cryptosporidium parvum* (CAMERON *et al.*, 2015), demonstrando também ser um agente promissor anti-*Toxoplasma* (GAAFAR *et al.*, 2014; ADEYMI *et al.*, 2017).

Dentre os parasitos, Cameron e colaboradores (2015) demonstraram a ação das nanopartículas de prata contra o protozoário *Cryptosporidium* com destruição de esporozoítos dentro de oocistos intactos visualizados por meio da coloração de iodeto de propídio.

Em adição, um estudo realizado por Allahverdiyev e colaboradores (2011), demonstrou *in vitro* que *Leishmania tropica* foi capaz de inibir a produção de ROS, e que nanopartículas de prata apresentaram efeito leishmanicida com produção exógena deste produto. Ainda com o mesmo parasito, Baiocco e colaboradores (2011) verificaram que nanopartículas de prata apresentaram efeito antiproliferativo dose dependente sobre as formas promastigotas, demonstrando que concentrações menores (de 1 a 10 μ M), apresentaram efeito leishmaniostático. Por outro lado, concentrações maiores foram altamente tóxicas para os macrófagos provocando lise celular.

Ainda sobre protozoários do gênero *Leishmania*, um estudo realizado pelo nosso grupo demonstrou que o tratamento com nanopartículas biogênicas de prata resultam em morte da forma promastigota de *Leishmania amazonenses in vitro*. Esse mecanismo de morte ocorre por eventos semelhantes a apoptose devido à produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS), perda da integridade mitocondrial, exposição de fosfatidilserina e danos na membrana do parasito. Além disso, o tratamento com AgNp-Bio atuou na capacidade imunomodulatória de macrófagos infectados, reduzindo a infecção da forma amastigota, porém sem induzir a síntese de mediadores inflamatórios, como ROS e NO. Ademais, sugere-se que o composto tenha efeito direto sobre amastigotas, visto que ocorreu dano ultraestrutural significativo em amastigotas intracelulares (FANTI *et al.*, 2018).

Especificamente em relação ao protozoário *T. gondii*, trabalho realizado por Gaafar e colaboradores (2014), demonstrou que as nanopartículas

de prata apresentaram um efeito anti-*Toxoplasma* em modelo murino, sendo que todos os animais que receberam esse composto mostraram redução significativa no número carga parasitária no fígado e no baço, quando comparados ao grupo controle (animais infectados e sem tratamento). Além disso, esse tratamento propiciou a paralisia do movimento do parasito e causou deformações nos taquizoítos, com formação de múltiplos sulcos irregulares e desorganização do conóide observados por microscopia eletrônica de varredura.

Outro estudo desenvolvido por Adeyemi e colaboradores (2017) avaliou a ação anti-*T.gondii* de nanopartículas de ouro, prata e platina, demonstrando redução da invasão e replicação do parasito, assim como danos na membrana mitocondrial e potencial de infectividade de *T. gondii*.

Outros trabalhos com *T. gondii* foram realizados por Anand e colaboradores (2015), utilizando nanocápsulas de lactoferrina (BLF-NC). O tratamento com BLF-NC aumentou a biodisponibilidade de BLF nos tecidos. Os tratamentos reduziram a inflamação e a carga parasitária além de aumentar a produção intracelular de espécie reativa de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) no fígado e no baço, sendo mais proeminente no grupo BLF-NC. Os autores também evidenciaram níveis elevados de citocinas de padrão Th1, ROS, NO que colaboraram para o extermínio de parasitos nos tecidos bem como auxílio na sobrevivência dos animais até 25 dias após a infecção.

Apesar dos diferentes trabalhos sobre a atividade das AgNp, ainda não há pesquisas sobre experimentos realizados com nanopartículas de prata sintetizadas de forma biogênica utilizando modelos de infecção envolvendo células humanas e protozoários, como *Toxoplasma gondii*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação anti-proliferativa e imunológica das nanopartículas biogênicas de prata (AgNp-Bio) em células HeLa frente à infecção experimental pela cepa RH de *Toxoplasma gondii*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a citotoxicidade do tratamento com nanopartículas biogênicas de prata nas células HeLa;
- Determinar a atividade parasitária de *T. gondii* (cepa RH), em células HeLa tratadas ou não com nanopartículas biogênicas de prata;
- Analisar a produção de mediadores inflamatórios (óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio) em células HeLa infectadas ou não pela cepa RH de *T. gondii* e tratadas ou não com nanopartículas biogênicas de prata.
- Analisar a imunomodulação das citocinas (padrão Th1 e Th2) frente infecção pela cepa RH de *T. gondii* em células HeLa tratadas ou não com nanopartículas biogênicas de prata.

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Segundo normas da ABNT NBR 6023

ADAIR, B. M. Nanoparticle vaccines against respiratory viruses. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v.1, n.1, p. 405–414. 2009.

ADEYEMI, O. S.; MURATA, Y.; SUGI, T.; KATO, K.; Inorganic nanoparticles kill *Toxoplasma gondii* via changes in redox status and mitochondrial membrane potential. *International Journal of Nanomedicine*. v.12, n.1, p. 1647-1661, 2017.

AFZALI, B.; LOMBARDI, G.; LECHLER, R, I.; LORD, G, M. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clinical and Experimental Immunology*. v.148, n. 1, p. 32-46, 2007.

AJZENBERG, D.; COGNE, N.; PARIS, L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings. *Journal Infectious Diseases*, v.186, n. 5, p. 684-689, 2002.

ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nature Reviews Immunology*, London, v. 5, n. 2, p. 162-170, fev. 2005.

ALLAHVERDIYEV, A. M., ABAMOR, E. S., BAGIROVA, M., USTUNDAG, C. B., KAYA, C., KAYA, F., RAFAILOVICH, M. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *International Journal of Nanomedicine*, v. 6, n.1, p. 2705– 2714, 2011.

AMENDOEIRA, M. R. R. Mecanismos de transmissão da toxoplasmose. *Anais da Academia Nacional de Medicina*. Brasil, v. 155, n. 4, p. 224-225, 1995.

ANAND, N., SEHGAL, R., KANWAR, R. K., DUBEY, M. L., VASISHTA, R. K., KANWAR, J. R. Oral administration of encapsulated bovine lactoferrin protein nanocapsules against intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 6355, 2015.

ANDERSON, A. C. Targeting DHFR in parasitic protozoa. *Drug Discovery Today*. v. 10, n. 2, p. 121-128, 2005.

ANTCZAK, M., DZITKO, K., DŁUGOŃSKA, H. Human toxoplasmosis–Searching for novel chemotherapeutics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 82, p. 677-684, 2016.

ARVIZO, O. R.; MIRANDA, O. R.; THOMPSON, M. A.; PABELICK, C. M.; BHATTACHARYA, R. B.; ROBERTSON, J. D.; ROTELLO, V. M.; PRAKASH, Y. S.; MUKHERJEE, P. Effect of nanoparticle surface charge at the plasma membrane and beyond. **Nano Letters**, v. 10, n. 1, p. 2543–2548, 2010.

ASHARANI, P. V.; LOW KAH MUN, G.; HANDE, M. P. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS Nano**, v. 3, n. 1, p. 279–290, 2009.

ASSOLINI, J. P.; CONCATO, V. M.; GONÇALVES, M. D., CARLOTO, A. C. M.; CONCHON-COSTA, I., PAVANELLI, W. R., MELANDA, F. N.; COSTA, I. N. Nanomedicine advances in toxoplasmosis: diagnostic, treatment, and vaccine applications. **Parasitology research**, v. 116, n. 6, p. 1603-1615, 2017.

BABAIE, J.; AMIRI, S.; HOMAYOUN, R.; AZIMI, E.; MOHABATI, R.; BERIZI, M.; SADAIE, M. R.; GOLKAR, M. 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, nov. 2017.

BAIOCCO, P.; ILARI, A.; CECI, P.; ORSINI, S.; GRAMICCIA, M.; DI MUCCIO, T.; COLOTTI, G. Inhibitory effect of silver nanoparticles on trypanothione reductase activity and *Leishmania infantum* proliferation. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 3, p. 230–233, 2011.

BARBOSA, M. A.; *et al.* Potenciais alternativas terapêuticas em estudo para a toxoplasmose congênita: Uma revisão bibliográfica. **Revista de Patologia Tropical**. v. 44, n. 1, p. 1-11, 2015.

BARRAGAN, A.; BROSSIER, F.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM 1) with the parasite adhesin MIC2. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 561-568, 2005.

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

BLANCO, M. L.; NETO, A. C. O fator nuclear Kappa B: uma nova perspectiva para o estudo de drogas antiinflamatórias. **Revista de Ciências Médicas**, v. 12, n. 4, 2003.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do diferente strains cause diferente disease? **Current opinion in microbiology**, London, v. 5, n. 4, p. 438-42, 2002.

BOUCHUT, A.; GEIGER, J. A.; DE ROCHER, A. E.; MARILYN PARSONS, M. Vesicles Bearing *Toxoplasma* Apicoplast Membrane Proteins Persist Following Loss of the Relict Plastid or Golgi Body Disruption. **PLoS One**. v. 9, n. 11, p. e112096, 2014.

BRUNET, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. **International immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1457–1467, 2001.

CAMERON, P.; GAISER, B. C.; BHANDARI, B.; BARTLEY, P. M.; KATZER, F.; BRIDLE, H.; Silver Nanoparticles Decrease the Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 82, n. 2, p. 431-437, 2015.

CARNEIRO, A. C. A. V. Caracterização molecular de isolados de *Toxoplasma gondii* obtido de crianças com toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011, p. 191. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Parasitologia). Universidade Federal de Minas Gerais (Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas).

CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, v. 81, n. 2, p. 111-122, 2002.

CENCI-GOGA, B. T.; ROSSITTO, P. V.; SECHI, P.; McCRINDLE, C. M. E.; CULLOR, J. S. *Toxoplasma* in Animals, Food, and Humans: An Old Parasite of New Concern. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 7, p. 751-762, 2011.

COMMODARO, A. G.; BELFORT, R. N.; RIZZO, L. V.; MUCCIOLI, C.; SILVEIRA, C.; BURNIE, J. R. M.N.; BELFORT, JR. R. Ocular toxoplasmosis - an update and review of the literature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 345–350, 2009.

COPPENS, L.; DUNN, J. D.; ROMANO, J. D.; PYPART, M.; ZHANG, H.; BOOTHROYD, J. C.; JOINER, K. A. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. **Cell**, v. 125, n. 2, p. 261-274, 2006.

CORDEIRO, C. A.; MOREIRA, P. R.; DUTRA, W. O.; YOUNG, L.; CAMPOS, W. R.; ORÉFICE, F.; TEIXEIRA JÚNIOR, A. L. Immunology of the Toxoplasmic etinochoroiditis. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 73, n. 6, p. 548-551, 2010.

DARDÉ, M. L. *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. **Parasite**. v. 15, n. 3, p. 366-71, 2008.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 569–588, 1998.

DEROUIN, F.; JACQZ-AIGRAIN, E.; THULLIEZ, P.; COUVREUR, J.; LEPORT, C. Cotrimoxazole for prenatal treatment of congenital toxoplasmosis? **Parasitology Today**. v. 16, n. 6, p. 254-256, 2000.

DESHPANDE, P. S.; KOTRESHA, D.; NOORDIN, R.; YUNUS, M. H.; SAADATNIA, G.; GOLKAR, M.; OSMAN, S.; KARIM, I. Z.; GHAFFARIFAR F. IgG avidity Western Blot using *Toxoplasma gondii* rGRA-7 cloned from nucleotides 39-711 for serodiagnosis of acute toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 2, p. 79-83, 2013.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cyst. **Clinical Microbiology**. v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P.; APPLEWHAITE, L.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; BANDINI, L. A.; KWOK, O. C. H.; HILL, R.; SU, C. Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America identified several unique and common parasite genotypes. **Parasitology**, v. 134, n. 11, p. 1559–1565, 2007.

DUBEY, J. P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 190-195, 2009.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C. JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**. v. 139, n. 11, p.1375-1424, 2012.

DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. In: Seminars in immunopathology. **Springer-Verlag**, 2012. p. 793-813.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; ALVES, O. L.; DE SOUZA, G. I. H.; ESPOSITO, E. MECHANISTIC. Aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, n. 8, p. 1-7, 2005.

DURÁN, N.; DURÁN, M.; JESUS, M. B.; SEABRA, A. B.; FÁVARO, W. J.; NAKAZATO, G. Silver Nanoparticles: A New View on Mechanistic Aspects on Antimicrobial Activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 3, p. 789-799, 2016.

DZIADEK, B.; DZIADEK, J.; DLUGONSKA, H. Identification of *Toxoplasma gondii* proteins binding human lactoferrin: a new aspect of rhoptry proteins function. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 3, p. 277-282, 2007.

EDMUNDSON, M.C.; CAPENESS, M.; HORSFALL, L. Exploring the potential of metallic nanoparticles within synthetic biology. **New Biotechnology**. v. 31, n. 6, p. 572-578, 2014.

ELSHEIKHA, H. M. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. **Public Health**. v. 122, n. 4, p. 335-353, 2008.

EMELIA, O.; RAHANA, A. R.; MOHAMAD FIRDAUS, A.; CHENG, H. S.; NURSYAIRAH, M. S.; FATINAH, A. S.; AZMAWATI, M. N.; SITI, N. A.; AISAH, M. Y. IgG avidity assay: a tool for excluding acute toxoplasmosis in prolonged IgM titer sera from pregnant women. **Tropical biomedicine**, v. 31, n. 4, p. 633-640, 2014.

FANTI, J.R.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; MIRANDA-SAPLA, M.M.; CAETANO, A.H.D.; ANDRADE, C.G.T.J.; PANIS, C.; RODRIGUES, J.H.S.; WOWK, P.F.; KUCZERA, D.; COSTA, I.N.; NAKAMURA, C.V.; NAKAZATO, G.; DURÁN, N.; PAVANELLI, W.R.; CONCHON-COSTA, I. Biogenic silver nanoparticles inducing *Leishmania amazonensis* promastigote and amastigote death *in vitro*. **Acta Tropica**. v. 178, n.1, p. 46-54, 2018.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. Ed- Diagnóstico laboratorial. Avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas, parasitária e auto-imunes. Correlação clínico-laboratorial. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001. 302p.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell' Istituto Superiori di Sanita**, v. 40, n. 1, p. 71-80, 2004.

FLEGR, J., PRANDOTA, J., SOVIČKOVÁ, M., ISRAILI, Z. H. Toxoplasmosis—a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e90203, 2014.

FOX, B.; KIAH L. S.; ROMMEREIM, L.; GUEVARA, R.B.; BZIK, D. J. Secretion of Rhoptry and Dense Granule Effector Proteins by Nonreplicating *Toxoplasma gondii* Uracil Auxotrophs Controls the Development of Antitumor Immunity. **Plos Genetics**, v. 1, p. 1-32. 2016.

FRANCO, P. S.; SILVA, N. M.; BARBOSA, B. F.; GOMES, A. O.; IETTA, F.; SHWAB, E. K.; SU, C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. **Front Microbiol.**, v. 6, n. 181, p. 1-13, 2015.

GAAFAR, M. R.; MADY, R. F.; DIAB, R. G.; SHALABY, T. I. Chitosan and silver nanoparticles: promising anti-*Toxoplasma* agents. **Experimental parasitology**, v. 143, n. 1, p. 30-38, 2014.

GAIKWAD, S.; INGLE, A.; GADE, A.; RAI, M.; FALANGA, A.; INCORONATO, N.; RUSSO, L.; GALDIERO, S.; GALDIERO, M. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4303, 2013.

GAUMET, M.; GURNY, R.; DELIE, F. Localization and quantification of biodegradable particles in an intestinal cell model: The influence of particle size. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.36, n.4, p.465–473, 2009.

GAZZINELLI, R. T.; MENDONÇA-NETO, R.; LILUE, J.; HOWARD, J.; SHER, A. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: an evolutionary tale of mice, cats, and men. **Cell host & Microbe**, v. 15, n. 2, p. 132-138, 2014.

GOODSON, M. B.; DON WINSLOW. *Toxoplasma gondii*: Prevalence in Humans and Animals, Genetic Structure and Role in Disease Distribution. **Nova Science Publishers**, Inc.; 1ª Edição, 2013.

GUITON, R.; VASSEUR, V.; CHARRON, S.; ARIAS, M.T.; VAN LANGENDONCK, N.; BUZONI-GATEL, D.; RYFFEL, B.; DIMIER-POISSON, I. Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 202, n. 3, p. 427-35, 2010.

GUTIÉRREZ, V.; SEABRA, A. B.; REGUERA, R. M.; KHANDARE, J.; CALDERÓN, M.; New Approaches from Nanomedicine for treating Leishmaniasis. **Chemical Society Reviews**. v. 45, n. 1, p. 152-168, 2016.

HAKIMI, M.; OLIAS, P.; SIBLEY, D. *Toxoplasma* Effectors Targeting Host Signaling and Transcription. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 615-645, 2017.

HARTMANN, A. K. Multiple routes of phosphatidylethanolamine biogenesis ensure membrane integrity of *Toxoplasma gondii*. 2016.

HOLLAND, G. N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. **American Journal of Ophthalmology**. v. 137, n. 1, p. 1-17, 2004.

HU, S.; WEI, W.; KORNER, H. The role of monocytes in models of infection by protozoan parasites. **Molecular immunology**, v. 88, p. 174-184, 2017.

HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature reviews Microbiology**. v. 10, n. 11, p. 766-778, 2012.

KASPER, L. H.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii*: immunology and molecular biology. In: WARREN, K. S. Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infection, 3ª edição. Cambridge, 1993.

KATZUNG, B.C. **Farmacologia Básica & Clínica**. 9º edição, p. 546 - 554, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KELLY, M. N.; KOLLS, J. K.; HAPPEL, K.; SCHWARTZMAN, J. D.; SCHWARZENBERGER, P.; COMBE, C.; MORETTO, M.; KHAN, I. A. Interleukin-17/interleukin-17 receptor- mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. **Infection Immunity**. v. 73, n. 1, p. 617-621, 2005.

KHALIL, N. M., T. C. F.; CASA, D. M.; DALMOLIN, L. F.; DE MATTOS, A. C.; HOSS, I.; *et al.* Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 353-360, 2013.

KHAN, A.; DUBEY, J. P.; SU, C.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; SIBLEY, L. D. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International Journal for Parasitology**. v. 41, n. 6, p. 645-655, 2011.

KHAN, W.; KHAN, K.. Congenital toxoplasmosis: An overview of the neurological and ocular manifestations. **Parasitology international**, v. 67, n.6, p. 715-721, 2018.

KIM, J.; OH, Y. K.; KIM, Y. J.; CHO, S.; AHN, M. H.; CHO, Y. J. Nuclear factor-kappa B plays a major role in the regulation of chemokine expression of HeLa cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. **Parasitology research**, v. 87, n. 9, p. 758-763, 2001.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal for Parasitology, England**, v. 34, n.3, p. 423-432, 2004.

KODJIKIAN, L. *Toxoplasma* and pregnancy. **Journal Français D'Ophtamologie**. v.33, n. 5, p. 362-367, 2010.

KORA, A. J.; SASHIDHAR, R. B. Antibacterial activity of biogenic silver nanoparticles synthesized with gum ghatti and gum olibanum: a comparative study. **The Journal of antibiotics**, v. 68, n. 2, p. 88, 2015.

KRUEGER, W, S.; HILBORN, E. D.; CONVERSE, R. R.; WADE, T. J. Drinking water source and human *Toxoplasma gondii* infection in the United States: a cross-sectional analysis of NHANES date. **BMC Public Health, United States**, v.14, n. 711, p. 1471-2458, 2014.

LARA, H. H.; AYALA-NUÑEZ, N. V.; IXTEPAN-TURRENT, L.; RODRIGUEZ-PADILLA, C. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 8, n. 1, p. 1, 2010.

LEÃO, P. R.; MEIRELES FILHO, J.; MEDEIROS, S. F. Toxoplasmosis: seroprevalence in postpartum women attended by SUS (Brazilian Public Health System). **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 8, p. 627-632, 2004.

LI, W. R.; XIE, X. B.; SHI, Q. S.; DUAN, S. S.; OUYANG, Y. S.; CHEN, Y. B. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. **BioMetals**. v. 24, n. 1 p. 135–141, 2011.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation. **European Journal of Immunology**. v. 36, n.10, p. 2735–2744, 2006.

MACHALA, L.; KODYM, P.; MALY, M.; GELENEKY, M.; BERAN, O.; JILICH, D. Toxoplasmosis in immunocompromised patients. **Epidemiologie, Mikrobiologie, Immunologie**, v. 64, n. 2, p. 59-65, 2015.

McFADDEN, G. I. The apicoplast. Review. **Protoplasma**. v. 248, p. 641–650, 2011.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology, England**, v.39, n. 1, p. 23-39, 2009.

MITSUKA-BREGANÓ, R.; LOPES-MORI, F. M. R.; NAVARRO, I. T. Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas. 2010.

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.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**. v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological Reviews**, v. 240, n. 1, p. 269-85, 2011.

MORAIS, R. D. A. P. B.; FREIRE, A. B. C.; BARBOSA, D. R. L.; SILVA, L. D. C. T. D.; PINHEIRO, A. F.; COSTA, S. S. D., *et al.* Surto de toxoplasmose aguda no Município de Ponta de Pedras, Arquipélago do Marajó, Estado do Pará, Brasil:

características clínicas, laboratoriais e epidemiológicas. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. esp, p. 143-152, 2016.

NASR, I. A.; AHMED, F.; PULLISHERY, F.; EL-ASHRAM, S.; RAMAIAH, V. V. Toxoplasmosis and anti-Toxoplasma effects of medicinal plant extracts-A mini-review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 8, p. 730-734, 2016.

NASROLLAHI, A; POURSHAMSIAN, K. H.; MANSOURKIAEE, P. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. **International Journal of Nano Dimension**, v. 1, n. 3, p. 233-239, 2011.

NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **science**, v. 311, n. 5761, p. 622-627, 2006.

NISHIKAWA, Y.; IBRAHIM, H. M.; KAMEYAMA, K.; SHIGA, I.; HIASA, J.; XUAN, X. Host cholesterol synthesis contributes to growth of intracellular *Toxoplasma gondii* in macrophages. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 73, n. 5, p. 633-639. 2011.

OLIVEIRA, T. C. Avaliação dos efeitos *in vitro* e *in vivo* do extrato total de *Artemisia annua* L. no controle da infecção aguda por *Toxoplasma gondii*. Uberlândia, 2007. 91 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia.

OZ, H. S. Maternal and congenital toxoplasmosis, currently available and novel therapies in horizon. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 385, 2014.

PELLOUX, H.; PERNOD, G.; RICARD, J.; RENVERSEZ, T.C.; AMBROISE-THOMAS, P. Interleukin-6 is secreted by human monocytes after stimulation with anti-*Toxoplasma gondii* sera. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 169, n. 5, p. 1181-1182, Mai., 1994.

POLLARD, A. M.; ONATOLU, K. N.; HILLER, L.; HALDAR, K.; KNOLL, L. J. Highly polymorphic family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens with evidence of developmental regulation in *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 1, p. 103-110, 2008.

PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. v. 38, n. 5, p. 561-569, 2008.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**. v. 12, n. 3, p. 214-223, 2007.

PIFER, R.; YAROVINSKY, F. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 388-393, 2011.

REMINGTON, J. S. *et al.* In: **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 8ª Ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2016.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 25, n. 2, p. 264–296, 2012.

RODRIGUES, A. G.; PING, L.Y.; MARCATO, P.D.; ALVES, O.L.; SILVA, M.C.; RUIZ, R.C.; MELO, I.S.; TASIC, L.; De SOUZA, A.O. Biogenic antimicrobial nanoparticles produced by fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 97. n.2, p. 775-782, 2012.

SAADATNIA, G.; GOLKAR, M. A review on human toxoplasmosis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p. 805-14, 2012.

SAEJI, J. P. J.; BOYLE, J. P.; BOOTHROYD, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infect host. **Trends in Parasitology**. v.21, n.10, p.476-481, 2005.

SANGUINÉDO, P.; FRATILA, R. M.; ESTEVEZ, M. B.; DE LA FUENTE, J. M.; GRAZÚ, V.; ALBORÉS, S. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using fungi and their antibacterial activity. **Nano Biomedicine and Engineering**, v. 10, p. 165-173, 2018.

SANTANA, S. S. Análise cinética da resposta imune humoral contra a proteína recombinante SAG2A em pacientes com toxoplasmose aguda. Uberlândia, 2011. 82p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia.

SANTOS, F. S. Avaliação da resposta imune em caprinos infectados experimentalmente por *Toxoplasma gondii*. Salvador, 2015. 89 p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal nos Trópicos). Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia.

SANTOS, S. O.; GARCIA, J. F.; SILVA, N. S. Toxoplasmose alimentar: diferentes agravos e diagnósticos. **Revista Cuidado em Enfermagem**, CESUCA-Goiânia, v. 2, n. 3, p. 1-11, 2016.

SCANDORIEIRO, S.; DE CAMARGO, L. C.; LANCHEROS, C. A.; YAMADA-OGATTA, S. F.; NAKAMURA, C. V.; DE OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE, C. G.; DERAN, N.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. Synergistic and additive effect of orégano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug resistant bacterial strains. **Frontiers in microbiology**. v. 23, n. 7, p. 760, 2016.

SHAMELI, K.; AHMAD, M. B.; JAZAYERI, S. D.; SHABANZADEH, P.; SANGPOUR, P.; JAHANGIRIAN, H.; GHARAYEBI, Y. Investigation of antibacterial properties silver nanoparticles prepared via green method. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 73, 2012.

SHRIVASTAVA, S.; BERA, T.; ROY, A.; SINGH, G.; RAMACHANDRARAO, P.; DASH, D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 18, n. 22, p. 225103, 2007.

SHWAB, E. K.; JIANG, T.; PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 2, p. 141-146, 2016.

SIBLEY, L.D.; MORDUE, D.G.; SU, C.; ROBBEN, P.M.; HOWE, D.K. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. **Philos Transactions Royal Society**. v. 357, p. 81-88, 2002.

SIBLEY, L.D.; AJIOKA, J.W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Annual review of Microbiology**, v. 62, p. 329-351, 2008.

SIBLEY, L. D.; KHAN, A.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 364, n. 1530, p. 2749-2761, 2009.

SILVA, P. Sulfonamidas e outros quimioterápicos. In: Farmacologia. 5ª Ed. Guanabara Koogan, Cap. 114, p.1021-1035, 1998.

SILVA, R. C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. **Parasitology Research**, v. 105, n. 4, p. 893- 898, 2009.

SKARIAH, S.; McINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitology Research**. v. 107, n. 2, p, 253-260, 2010.

SONG, H.; RIOUX, R. M.; HOEFELMEYER, J. D.; KOMOR, R.; NIESZ, K.; GRASS, M.; *et al.* Hydrothermal growth of mesoporous SBA-15 silica in the presence of PVP-stabilized Pt nanoparticles: synthesis, characterization, and catalytic properties. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 9, p. 3027-3037, 2006.

SOUZA, W.; DUARTE, E. D. S. M.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R. C. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**. v. 20, n. 1, p. 131-143, 2010.

STRAUB, K.; CHENG, S.; SOHN, C.; BRADLEY, P. Novel components of the Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 590-603, 2009.

STUTZ, A.; KESSLER, H.; KASCHEL, M. E.; MEISSNER, M.; DALPKE, A. H. Cell invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii*. **Immunobiology**, v. 217, n. 1, p. 28-36, 2012.

SUBAUSTE, C. S.; KONIARIS, A. H.; REMINGTON, J. S. Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii* infected cells. **Journal of Immunology**, v. 147, n. 11, p. 3955-3959, 1991.

TAKAHASHI, E. E.; ROSSI, C. L. IgM and IgA antibody responses in 12 cases of human acquired toxoplasmosis. **Revista Instituto Medicina Tropical Sao Paulo**, v. 39, n. 6, p. 327-31, 1997.

TANIMURA, K.; NISHIKAWA, A.; TAIRAKU, S.; SHINOZAKI, N.; DEGUCHI, M.; MORIZANE, M.; EBINA, Y.; MORIOKA, I.; YAMADA, H. The IgG avidity value for the prediction of *Toxoplasma gondii* infection in the amniotic fluid. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 21, n. 9, p. 668-671, 2015.

TERRAZAS, C.A.; JUAREZ, I.; TERRAZAS, L.I.; SAAVEDRA, R.; CALLEJA, E.A.; RODRIGUEZ-SOSA, M. *Toxoplasma gondii*: impaired maturation and pro-inflammatory response of dendritic cells in MIF-deficient mice favors susceptibility to infection. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 3, p. 348-358, 2010

TOMIOTTO-PELLISSIER, F., MIRANDA-SAPLA, M. M., MACHADO, L. F., DA SILVA BORTOLETI, B. T., SAHD, C. S., CHAGAS, A. F., *et al.* Nanotechnology as a potential therapeutic alternative for schistosomiasis. **Acta tropica**, v. 174, p. 64-71, 2017.

TORRES-SANGIAO, E.; HOLBAN, A.; GESTAL, M. Advanced nanobiomaterials: vaccines, diagnosis and treatment of infectious diseases. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 867, 2016.

VALLOCHI, A. L.; MUCCIOLI, C.; MARTINS, M. C.; SILVEIRA, C.; BELFORT, R. Jr.; RIZZO, L. V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, n. 2, p. 350-351, 2005.

WANG, X.; KANG, H.; KIKUCHI, T.; SUZUKI, Y. Gamma interferon production, but not perforin-mediated cytolytic activity, of T cells is required for prevention of toxoplasmic encephalitis in BALB/c mice genetically resistant to the disease. **Infection and Immunity**, v. 72, no 8, p. 4432–4438, 2004.

WONG, K. K., LIU, X. Silver nanoparticles: the real “silver bullet” in clinical medicine?. **MedChemComm**, v. 1, n. 2, p. 125-131, 2010.

YAROVINSKY, F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 2, p. 109-121, 2014.

ZHANG, K., LIN, G., HAN, Y., & LI, J. Serological diagnosis of toxoplasmosis and standardization. **Clinica Chimica Acta**, v. 461, p. 83-89, 2016.

ZHENG, J.; WU, X.; WANG, M.; RAN, D.; XU, W.; YANG, J. Study on the interaction between silver nanoparticles and nucleic acids in the presence of cetyltrimethylammonium bromide and its analytical application. **Talanta**, v. 74, n. 1, p. 526–532, 2008.

ZHOU, X. W.; KAFSACK, B. F. C.; COLE, R. N.; BECKETT, P.; SHEN, R. F.; CARRUTHERS, V. B. The opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* deploys a diverse legion of invasion and survival proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 40, p. 34233- 34244, 2005.

ARTIGO CIENTÍFICO

**BIOGENIC SILVER NANOPARTICLES REDUCE ADHERENCE, INFECTION, AND
PROLIFERATION OF *Toxoplasma gondii* RH STRAIN IN HeLa CELLS WITHOUT
INFLAMMATORY MEDIATORS INDUCTION**

Revista: Parasitology

Fator de Impacto: 2,5

BIOGENIC SILVER NANOPARTICLES REDUCE ADHERENCE, INFECTION, AND PROLIFERATION OF *Toxoplasma gondii* RH STRAIN IN hela CELLS WITHOUT INFLAMMATORY MEDIATORS INDUCTION

Laís Fernanda Machado¹, Raquel Arruda Sanfelice¹, Larissa Rodrigues Bosqui¹, João Paulo Assolini¹, Sara Scandorieiro², Allan Henrique Depieri Cataneo⁴, Priscilla Fanini Wowk⁴, Gerson Nakazato², Italmar Teodorico Navarro³, Juliano Bordignon⁴, Wander Rogerio Pavanelli¹, Ivete Conchon-Costa¹, Idessania Nazareth Costa^{1*}

¹ Departamento de Patologia Experimental – Laboratório de Imunoparasitologia das Doenças Negligenciadas e Câncer. Universidade Estadual de Londrina, 86057-970 Londrina, Paraná, Brasil.

² Departamento de Microbiologia – Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada. Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública. Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil.

⁴ Laboratório de Virologia Molecular. Instituto Carlos Chagas, ICC/ Fiocruz, Curitiba, Paraná, Brasil.

* Corresponding author: idessania@hotmail.com, +55 43 99646-7200.

ABSTRACT

The highlights of biogenic silver nanoparticles (AgNp-Bio) include low toxicity – depending on size and concentration – and efficient antiparasitic activity. Therefore, the objective of this study was to assess the action of the AgNp-Bio on HeLa cells regarding the infection with *Toxoplasma gondii* HR strain. Firstly, we performed a cellular viability test and the characterization of the AgNp-Bio, followed by the infection of HeLa cells with *T. gondii* to be treated using AgNp-Bio or conventional drugs. Subsequently, we determined the level of standard cytokines Th1/Th2 as well as the content of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS). The results demonstrated that the AgNp-Bio presented a mean size of 69nm in diameter and obtained dose-dependent toxicity. In addition, at the concentrations of 3 and 6µM promoted a significant decrease in adherence, infection, and intracellular proliferation. We also found a reduction of IL-8 and low production of inflammatory mediators. Thus, the nanoparticles reduced the adherence, infection, and proliferation of ROS and NO in addition to immunomodulating IL-8. Therefore, the data found in this study proved relevant for having introduced a promising therapeutic alternative for toxoplasmosis.

Keywords: Silver nanoparticles; Toxoplasmosis; HeLa Cells.

KEY FINDINGS

- AgNp-Bio present dose-dependent toxicity in HeLa cells.
- AgNp-Bio reduces *T. gondii* activity in HeLa cells.
- AgNp-Bio did not increase NO and ROS production in HeLa cells infected with *T. gondii*.
- AgNp-Bio has the ability to immunomodulate IL-8 in HeLa cells infected with *T. gondii*.

Introduction

Toxoplasmosis is an infection caused by the compulsory intracellular protozoan *Toxoplasma gondii* and represents a public health issue that affects around 30% to 50% of the world population (Montazeri et al., 2017). In 90% of the causes, the infection develops without symptoms or is benign (Robert-Gangneux and Darde 2012; Krueger et al., 2014; CDC, 2015). However, immunocompromised individuals may develop a severe clinical picture (Sutherland et al., 2015; Atilla et al., 2015; Alday et al., 2017). The treatment used in symptomatic cases consists of the association of pyrimethamine and sulfadiazine, but these drugs are not well tolerated by the organism and interact indistinctly with biochemical processes of the parasite and host (Sepúlveda-Arias et al., 2014) generating adverse effects, such as the suppression of bone marrow, which may lead to megaloblastic anemia, leukopenia, and granulocytopenia (Petersen, 2007).

In this context, investment has focused on the study of nanomaterial, whose actions involve carrying drugs, decreasing toxicity, modulating pharmacokinetics, and increasing bioavailability, in addition to releasing the drug directly into the specific target (Khalil et al., 2013; Torres-Sangiao et al., 2016). Silver nanoparticles (AgNp) are commonly used for a variety of medical applications, especially for their anti-inflammatory and antimicrobial activities (Pourali and Yahyaei, 2016) (Shrivastava et al., 2007; Adair et al., 2010; Scandorieiro et al., 2016), which were reported in Gram-positive and Gram-negative bacteria (Shrivastava et al., 2007; Scandorieiro et al., 2016; Durán et al., 2016), filamentous fungi (Sanguineto et al., 2018), some types of viruses (Park et al., 2018; Sharma et al., 2019), and protozoa of the genus *Leishmania* (Allahverdiyev et al., 2011; Fanti et al., 2018; Isaac-Marquez et al., 2018). Furthermore, this metallic nanoparticle has remarkable properties, such as accumulation in tissues – perhaps even reaching cysts of *T. gondii* (Adeyemi and Sulaiman, 2015) – and the production of reactive oxygen species (ROS), which are able to kill infectious agents (Butkus et al., 2004; Bhardwaj et al., 2012).

It is known that metallic nanoparticles are promising anti-Toxoplasma agents (Gaafar et al., 2014; Assolini et al., 2017; Adeyemi et al., 2017; Adeyemi et al., 2018), but studies on these protozoa and biogenically synthesized silver

nanoparticles in human cells are yet to be developed. Therefore, the versatility of silver nanoparticles becomes an attractive option to be explored as antiparasitic agents, particularly against *T. gondii*, regarding which the study on the use of biogenic silver nanoparticles as therapeutic alternative for toxoplasmosis is pioneer. Thus, this paper assesses the anti-proliferative and immunological actions of AgNp-Bio in HeLa cells regarding the experimental infection by the *Toxoplasma gondii* RH strain.

Material and methods

HeLa Cells Culture

HeLa cells are a continuous cellular lineage that divide indefinitely – reason why they are called “immortal” – in addition to being the first human cells to have survived in vitro (Jones et al., 1971). Despite of being cancerous, they share many basic characteristics with normal cells, such as the production of proteins, intracellular communication and susceptibility to infection. Thus, it is possible to use them to study the basic functions performed by all human cells (Lucey et al., 2009).

The cells were grown in 75cm² culture flasks (Ciencor Scientific, Brazil) with *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco by life technologies) supplemented with 2% inactivated fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich), 1% antibiotics (10,000U/mL penicillin and 10mg/mL streptomycin solution) (Cultilab, Brazil), Lglutamine, sodium pyruvate and 2-mercaptoethanol (complete medium for HeLa – MCH). Cell cultures were maintained in an incubator with 5% CO₂ at 37°C and used cells in the passage 21 for the experimental assays as well as to maintain the *T. gondii* strains.

Maintenance of T. gondii RH strain

Tachyzoites of the *T. gondii* RH strain were granted by Prof. Itamar Teodorico Navarro, State University of Londrina, and maintained in the peritoneal cavity of 60-day-old Swiss mice at intervals of 48 to 72 hours. Peritoneal exudates derived from mice were collected in sterile PBS upon peritoneal massage and filtered to obtain the tachyzoite forms. This study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the State University of Londrina 88/2017/CEUA.

Silver Nanoparticles

AgNp-Bio were granted by Prof. Dr. Gerson Nakazato – Laboratory of Basic and Applied Bacteriology of the State University of Londrina (Paraná-Brazil) – and prepared according to a previously established method (Durán et al., 2005). This method of production has been patented (Patent, 2006, PI0605681-4A2). Briefly, AgNp-Bio were obtained after reduction of silver nitrate by *F. oxysporum*, strain 551, from the culture collection of the Molecular Genetics Laboratory of ESALQ-USP (Piracicaba, São Paulo, Brazil). *F. oxysporum* was cultivated on media containing 0,5% (w/v) yeast extract (Neogen), 2% (w/v) malt extract (Neogen), 2% (w/v) agar (Neogen) and distilled water at 28°C for 7 days. After growth, the fungal biomass was added to distilled water at 0,1g/mL and incubated at 28°C for 72 hours. Afterwards, the solution components were separated by filtration. AgNO₃ (Nuclear) at 1mM was added to fungal-free solution, and the system was incubated for several hours at 28°C in the absence of light. Periodically, aliquots of the solution system were removed and absorptions were measured using an ultraviolet-visible spectrophotometry (Varian Cary 50 Probe); the peak at 440nm corresponded to the surface plasmon resonance of silver nanoparticles.

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

A 1 mM AgNp-Bio solution was diluted in ultrapure water (1:600) and injected in the NanoSight LM10 system (NanoSight Ltd., Amesbury, UK). The particle movement was analyzed using NTA software (NanoSight Ltd.) with a 60-s video with a 30-frame rate per second. The NTA software was optimized to first identify and then track each particle on a frame-by-frame basis as well as track and measure its Brownian movement frame to frame. We also determined the particle size distribution.

Compounds Dilution

We performed the dilution of the biogenic silver nanoparticles (concentration of 10mM) according to the following steps: 100µL of the AgNp-Bio solution added with 900µL of DMEM, resulting in the concentration of 1mM; serial dilution to obtain the concentrations of 3 and 6µM. The dilution to reach the concentrations of 50 and 25µg/mL of sulfadiazine and pyrimethamine, respectively, was performed according to the descriptions of Sanfelice and collaborators (2017).

HeLa cell Viability by MTT Assay

The viability of HeLa cells after treatment with AgNp-Bio was evaluated on basis of mitochondrial oxidation, by means of the colorimetric MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Chemical Co., Brazil) (Mosmann, 1983). HeLa cells were grown in 96-well plates (3×10^4 cells/well/200 μ L) for 24 hours in MCH at 37°C and 5% CO₂. After this period, the cells were treated for 24 hours with the AgNp-Bio (3, 6, 9 and 12 μ M); sulfadiazine and pyrimethamine combination (50 and 25 μ g/mL, respectively) used as positive control; cells that received only MCH were used as the negative control. After treatment, the medium was removed, and the cells were incubated with MTT solution (5mg/mL) for 3 hours under the same growth conditions. The formazan crystals were solubilized in 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 50% dimethyl formamide (DMF), and after 30 minutes incubation, absorbance was read at 570 nm with a plate reader (TP Reader, Thermo Plate). The results were expressed as percentage of MTT reduction relative to the control group, calculated with the following formula: viable cells (%) = (Abs of treated cells/Abs of untreated cells) X 100.

Experimental Infection

We performed an experimental model of infection with pretreatment in order to assess the effect of the AgNp-Bio on adherence and an experimental model of invasion and proliferation of *T. gondii* in HeLa cells by applying a post-treatment experimental model.

We carried out the pretreatment model in 24-well plates containing culture of HeLa cells (1×10^5) adhered to 13mm round coverslips (Ciencor Scientific, Brazil). These cells were pre-treated by associating sulfadiazine and pyrimethamine (50 and 25 μ g/mL, respectively) (positive control) and AgNp-Bio at the concentrations of 3 and 6 μ M for 24 hours at 37°C with 5% of CO₂. The cells treated only with DMEM were considered negative control.

After the period of treatments, the cells were subjected to a 4%-paraformaldehyde fixation in phosphate buffered saline solution (PBS) for 30 minutes. Subsequently, the cells were washed to remove the excess of the fastener. Each pit was added with the *T. gondii* tachyzoites (5×10^5), which were subjected to a 4%-paraformaldehyde fixation after three hours of infection for 30 minutes, and the

glass slides were dyed with toloum chloride for five seconds (Castanheira et al., 2015).

For the post-treatment model, the HeLa cells (1×10^5) maintained in 24-well plates containing 13mm round coverslips (Ciencor Scientific, Brazil) were infected with 5×10^5 tachyzoites of the *T. gondii* RH strain. After three hours of infection, the cells were washed and treated with the association of sulfadiazine and pyrimethamine (50 and $25 \mu\text{g/mL}$), respectively, and AgNp-Bio at the concentrations of 3 and $6 \mu\text{M}$ for 24 hours. After the required time for both treatment models and upon coloring with toloum chloride at 1% (Sigma Chemical Co.), we assembled the glass slides for light microscope analysis (e100, Nikon – led).

We analyzed the cells through light microscopy with immersion magnification to verify the parameters of adherence and number of tachyzoites adhered per cell, as well as the infection index (number of infected cells every 200 cells examined) and parasite intracellular proliferation (total number of parasites every 200 cells examined).

The percentages of inhibition of infection with *T. gondii* as well as inhibition of intracellular proliferation of *T. gondii* were calculated according to the following: mean index of infection or intracellular proliferation analyzed in non-treated cells, corresponding to 100% of the index of infection or intracellular proliferation. The inhibition percentages of these parameters undergoing treatments with AgNp-Bio were calculated by subtracting the percent values obtained for treated cells from those obtained for non-treated cells (Barbosa et al., 2012). The supernatant of the cells was collected and stored at -80°C for further dosage of cytokines and nitric acid.

Determination of Nitrite as Estimative of NO Levels

Griess method was employed to determine nitric oxide (NO), according to the experiments previously conducted by our group (Tomiotto-Pelissier et al., 2018). Briefly, supernatant aliquots ($60 \mu\text{L}$) from the anti-mastigote assay supernatants were submitted to a two-minute centrifugation at 5000rpm, and a volume of $50 \mu\text{L}$ of the supernatant was recovered and added with $50 \mu\text{L}$ of Griess reagent (1% sulfanilamide and 0,1% of naphthyl ethylenediamine dihydrochloride in orthophosphoric acid (H_3PO_4) 5%). After 10 minutes incubation at room temperature, the samples were placed in 96-well microplates. A calibration curve was generated using dilutions of

NaNO₂, and the absorbance was determined at 550nm on microplate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific).

Estimative Determination of the Levels of Reactive Oxygen Species (ROS)

We performed the test according to the experiments previously conducted by our group (Tomiotto-Pelissier et al., 2018). Therefore, the HeLa cells (1×10^5) were maintained in 24-well plates containing 13mm round coverslips (Ciencor Scientific, Brazil) infected with 5×10^5 tachyzoites of the *T. gondii* RH strain. Aiming at assessing ROS production, the HeLa cells (1×10^5) infected with 5×10^5 tachyzoites of the *T. gondii* HR strain and treated for 24 hours with AgNp-Bio at the concentrations of 3 and 6 μ M were washed with PBS (pH 7.4) and charged with 10pM of a diacetate probe of 20, 70-dichlorofluorescein (H₂DCFDA) (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluted in DMSO and incubated in the dark (HeLa 30min, 37°C, CO₂ at 5%).

The reactive oxygen species (ROS) were measured as the increase in fluorescence caused by the conversion of the non-fluorescent dye into highly fluorescent 20,70-dichlorofluorescein with an excitation wavelength of 488nm and an emission wavelength of 530nm using a microplates fluorescence reader (Victor X3, PerkinElmer).

Determination of Cytokine Levels

We analyzed the levels of the cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-12p70, IL-8, IL-6, IL-10 present in the supernatant of the infected cells through a Cytometric Bead Array (CBA) according to the instructions in the kit (BD CBA Human Th1/Th2) using the equipment FACS Canto II by Becton Dickinson. The analysis of the cytometry data was performed on the software FCAP Array, v1.0.1, by Soft Flow Hungary Ltd. and generated the concentrations of the cytokines in pg/mL.

Statistical Analysis

All data represent the mean and standard deviation of three independent experiments performed in triplicate. Differences between treatments and controls were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test, using GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Statistical significance was considered when $P \leq 0.05$.

Results

Characterization of biogenic silver nanoparticles

A recent analysis on the production of biogenic silver nanoparticles (AgNp-Bio) by *Fusarium oxysporum* revealed that the silver nanoparticles coexist with chloride nanoparticles (AgCl) – named Ag@AgCl (Durán et al. 2016; Picoli et al., 2016). However, our study used the term AgNp-Bio to which our nanoparticle tracking analysis (NTA) revealed a mean diameter of 69.0nm (Figure 1).

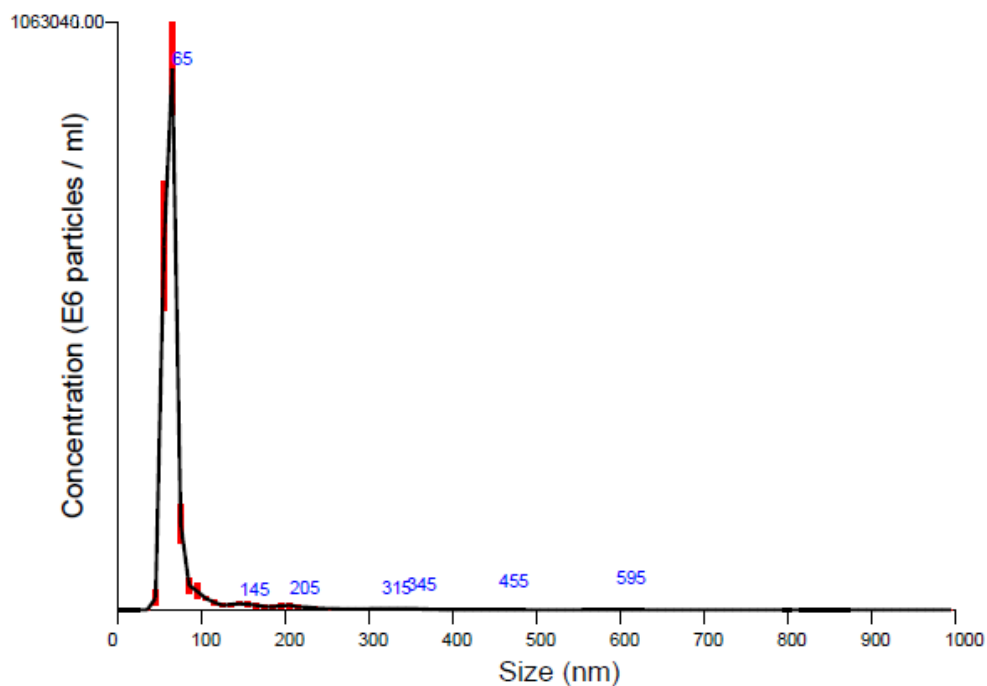


Figure 1. Distribution of the size of the particles detected through the nanoparticles tracking analysis and processed using the software NanoSight. Data represent the mean \pm SEM (error bars) of an independent analysis.

Treatment using biogenic silver nanoparticles (AgNp-Bio) has dose-dependent toxicity in HeLa cells

The treatment of the HeLa cells at the concentrations of 9 and 12 μ M reduced cellular viability in 17% and 31%, respectively, in relation to the negative control. However, the concentrations of 3 and 6 μ M for 24 hours maintained the cells viable, thus justified as the concentrations selected for the subsequent experiments. Additionally, the positive control (association of sulfadiazine and pyrimethamine at the concentrations of 50 and 25 μ g/mL, respectively) was not able to decrease cellular viability for 24 hours (Figure 2).

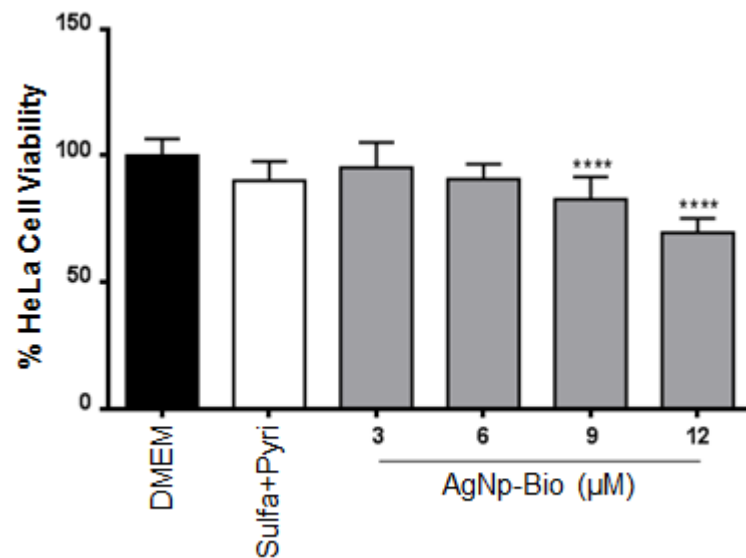


Figure 2. Viability testing through colorimetric tetrazolium salt assay MTT (3- [4.5-dimethylthiazol-2-yl] -2.5- diphenyltetrazolium; thiazolyl blue) in HeLa cells treated with AgNp-Bio at the concentrations of 3 and 6 μ M and the association of sulfadiazine and pyrimethamine (50 and 25 μ g/mL respectively) for 24 hours. Cells treated with DMEM were applied as negative control. ****Significantly different from the negative control ($p < 0.0001$). Three independent experiments were performed in triplicate (One – way ANOVA followed by Tukey test).

Biogenic silver nanoparticles reduce adherence, infection, and proliferation of tachyzoites in HeLa cells infected with T. gondii RH strain

The efficiency of the treatment using AgNp-Bio at the concentrations of 3 and 6 μ M was evaluated according to the processes of adherence through pretreatment test and indices of intracellular infection and proliferation of the tachyzoites of *T. gondii* at the post-treatment stage.

We found in the pretreatment experiments a decrease of 51% and 66% in the number of cells with tachyzoites adhered upon treatment with AgNp-Bio at the concentrations of 3 and 6 μ M, respectively (Figure 3A) ($p < 0.0001$) and 26% in the treatment using conventional drugs ($p < 0.05$) in relation to the negative control. Regarding the amount of tachyzoites adhered per cell, we found a reduction of 67% and 76% in the treatment using AgNp-Bio (3 and 6 μ M respectively) in relation to both the negative and positive controls ($p < 0.0001$) as well as a decrease of 42% in the treatment using conventional drugs in relation to the negative control ($p < 0.0001$) (Figure 3B).

For the post-treatment experiments, the infection indices showed a decrease of 78% and 90% in the cells infected regarding the concentrations of 3 μ M and 6 μ M, respectively, in relation to the negative control ($p < 0.0001$). In turn, the treatment using the association of sulfadiazine and pyrimethamine was responsible for a reduction of 56% in relation to the control ($p < 0.0001$) (Figure 3C).

Regarding the proliferation of tachyzoites in the HeLa cells, we detected a decrease of 82% upon treatment with AgNp-Bio (3 μ M) and 94% at the concentration of 6 μ M in relation to the negative control ($p < 0.0001$). Regarding the proliferation of infected cells treated with the association of sulfadiazine and pyrimethamine (50 μ g/mL and 25 μ g/mL) ($p < 0.0001$), we found a reduction of 86% in relation to the negative control (Figure 3D).

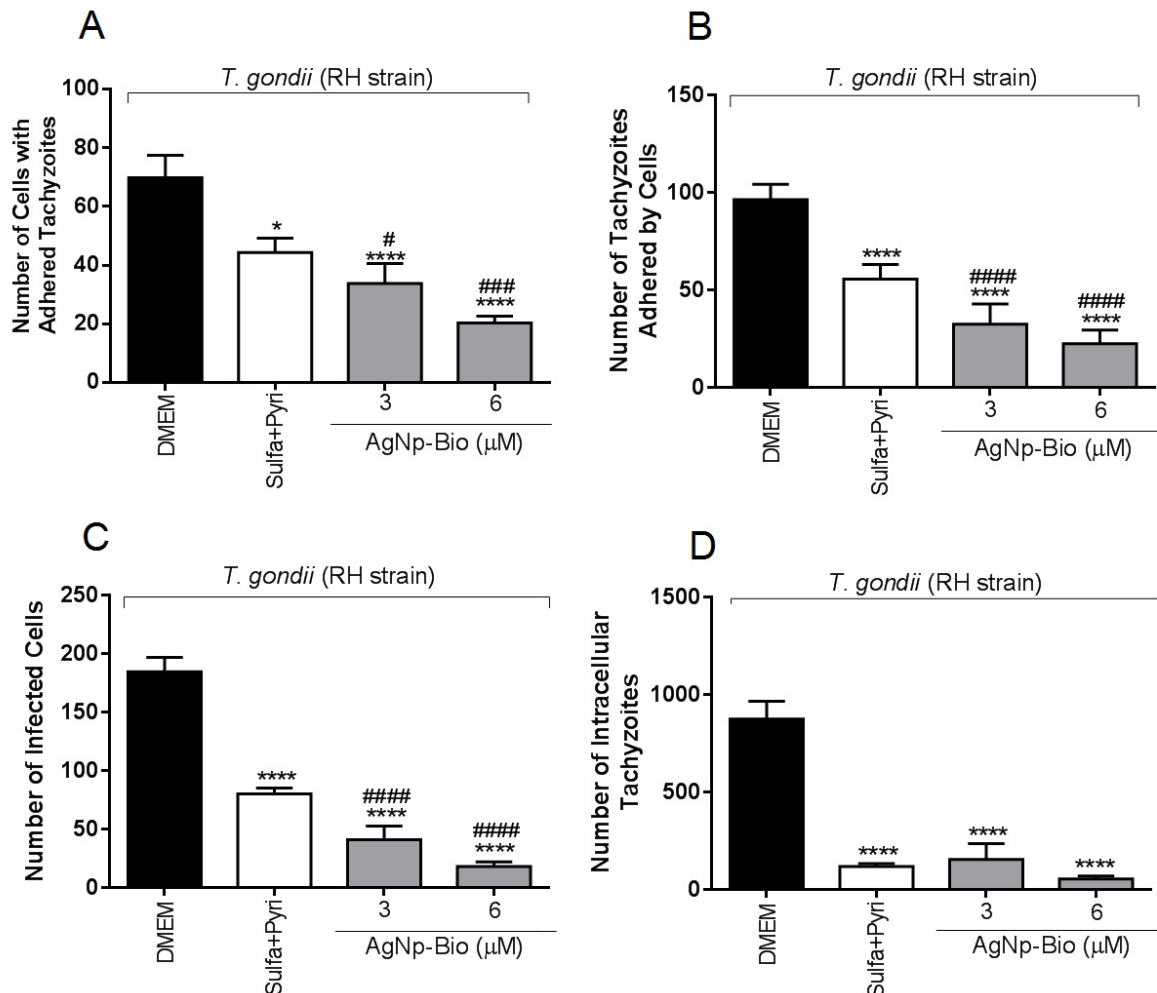


Figure 3. Infection test in HeLa cells with tachyzoites of *T. gondii* in vitro in the models of pre- and post- treatment with biogenic silver nanoparticles. HeLa cells infected with tachyzoites of *T. gondii* were treated with AgNp-Bio for 24 hours (3 and 6 μ M). The following parameters were assessed

adherence (A and B), number of infected cells (C), and intracellular proliferation of *T. gondii* (D). Tachyzoites treated with DMEM were considered as negative control and the treatment using the association of sulfadiazine and pyrimethamine (50 and 25 μ g/mL respectively) was considered as positive control. Data represent the mean \pm SEM of the three independent experiments performed in triplicate. *Significantly different from the negative control ($p < 0.05$). ****Significantly different from both the negative and positive controls ($p < 0.0001$) #Different from both the positive and negative controls ($p < 0.05$); ### ($p < 0.0005$); #### ($p < 0.0001$) (One-Way ANOVA followed by Tukey test).

Reduced replication of T. gondii is independent of NO and ROS

We assessed the treatment capacity to modulate the production of NO and ROS and found that the treatment using AgNp-Bio reduced the production of NO at the concentration of 6 μ M ($p < 0.005$), while the positive control also revealed a reduction in the levels of NO in relation to the negative control ($p < 0.05$) (Figure 4A). In addition, we carried out a ROS test using a fluorescent probe H2DCFDA in HeLa cells infected with *T. gondii* and treated at different concentrations of AgNp-Bio. The results indicated that the concentrations tested were not able to induce ROS production (Figure 4B).

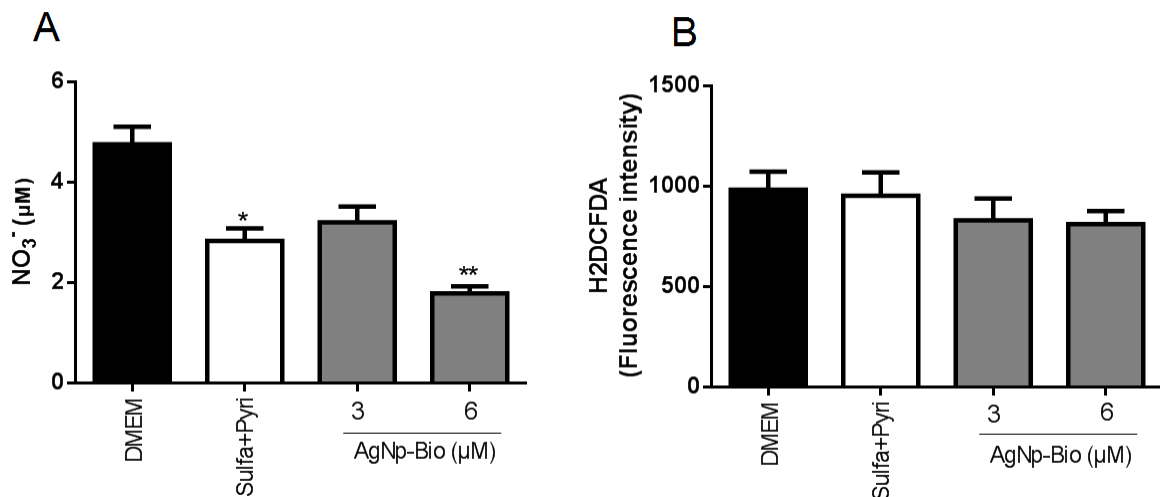


Figure 4. Death of *T. gondii* is dependent on NO and independent of ROS. The following methods were applied to assess the HeLa cells infected with *T. gondii* and subjected to the treatment using AgNp-Bio: (A) Griess method for nitrite levels; (B) fluorescent probe H2DCFDA for reactive oxygen species mediation. Data represent the mean \pm SEM of the three independent experiments performed in triplicate. *Significant difference in relation to the negative control ($p < 0.05$), ** ($p < 0.005$).

Cytokines

The cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70 and TNF- α did not present statistical differences in relation to the infected control or the positive control, as demonstrated in Figure 4.

However, the production of cytokine IL-8 presented statistically reduced indices having reached values of 50% and 89% at the concentrations of 3 and 6 μ M, respectively, in relation to the infected control. In turn, the treatment associated with sulfadiazine (50 μ g/mL) and pyrimethamine (25 μ g/mL) in relation to the infected control, with a reduction of 92% ($p < 0.0001$) (Figure 5C).

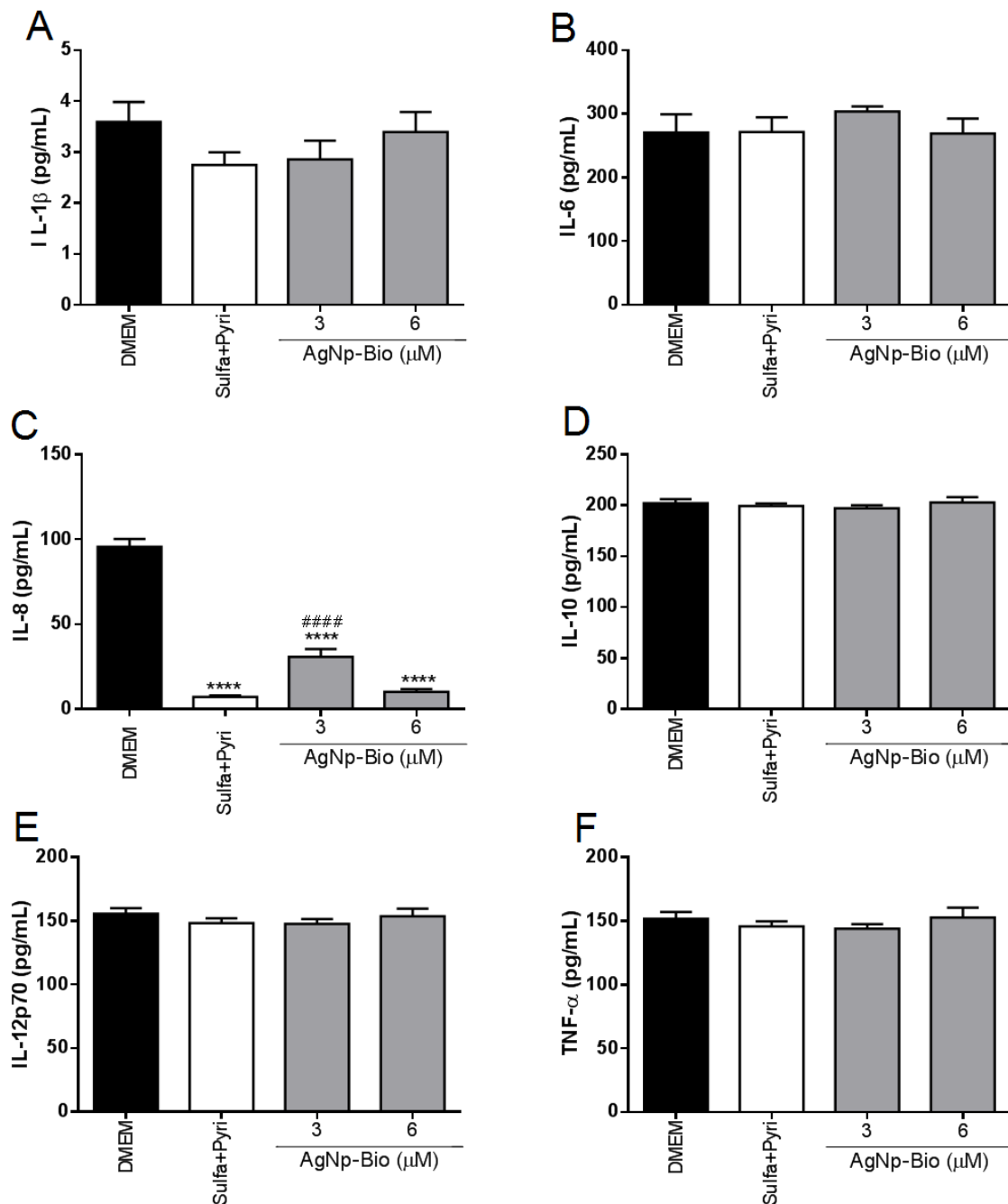


Figure 5. Levels of cytokines dosed from the supernatant of the infected HeLa cells cultures treated with AgNp-Bio and positive control (sulfadiazine and pyrimethamine) according to the instructions in the kit (BD CBA). Control was considered: HeLa cells infected with tachyzoites of *T. gondii* (infected control) and HeLa cells infected with *T. gondii* treated with sulfadiazine and pyrimethamine (50 and 25 μg/mL) (positive control) **** Different from the infected control ($p < 0.0001$); #### Different from the positive control ($p < 0.0001$) (One-Way ANOVA followed by Tukey test).

Photomicroscopy

Figure 6 presents illustrative images of light microscopy resulting from the dyeing of the infected HeLa cells treated with DMEM (negative control), conventional drugs (positive control) or AgNp-Bio and dyed with toloum chloride. Image 6A – infected HeLa cells without treatment – shows many infected cells with parasitic vacuoles containing a large amount of intracellular tachyzoites. Image 6B – infected HeLa cells treated with the association of sulfadiazine and pyrimethamine at the concentrations of 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, – reveals fewer vacuoles and intracellular parasites in relation to 6A. Images 6C and 6D – infected HeLa cells treated with AgNp-Bio at the concentrations of 3 and 6 μM , respectively, – presents fewer infected cells in relation to both the negative and positive controls.

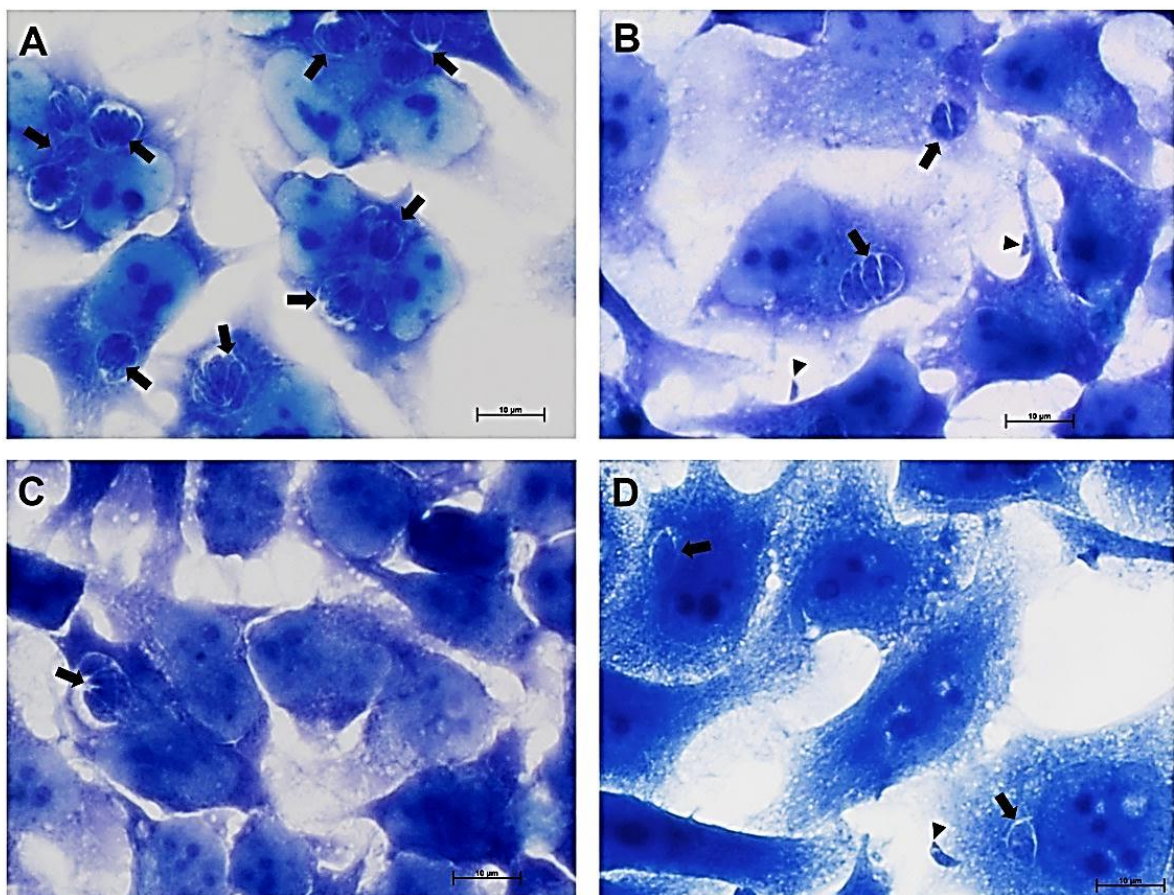


Figure 6. Photomicroscopy of experimental infection in HeLa cells treated for 24 hours and dyed with toloum chloride. HeLa cells infected with the *T. gondii* HR strain treated with DMEM medium (negative control) (A). HeLa cells infected and treated with the association of pyrimethamine and sulfadiazine (50 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively) (positive control) (B). HeLa cells infected with *T. gondii* and treated with AgNp-Bio at the concentrations of 3 μM (C) and 6 μM (D). Arrows indicate tachyzoites of *T. gondii* inside the parasitic vacuoles; edges of arrows point to tachyzoites adhered to the cells. Magnification of 1000x.

Discussion

The AgNp-Bio have a large surface area, single chemical properties, and small size, which provides them with the ability to surpass many biological barriers to transport therapeutic agents into the target tissue (Riehemann et al., 2009). Thus, they contribute significantly to an interdisciplinary field of sciences by offering a greater specificity as well as reduced collateral effects in relation to other conventional treatments existing in nanomedicine (Khanna et al., 2015).

Furthermore, among the different methods applied to synthesize nanoparticles, the biogenic process has the best performance and stability as well as the lowest toxicity (Gurunathan et al., 2014; Pourali et al., 2016; Girilal et al., 2018). Accordingly, previous studies confirm the theory that the biosynthesis of silver nanoparticles using bacteria (Das et al., 2014), fungi (Velhal et al., 2016), and plants (Arokiyaraj et al., 2017) have fewer toxic effects. Na example is the large-scale synthesis of nanoparticles by fungi with the production of extracellular enzymes or proteins (Duran et al., 2007; Velhal et al., 2016; Anbazhagan et al., 2017). However, further studies should explore the magnitude of the silver nanoparticles toxicity regarding human cells (Girilal et al., 2015).

According to the results obtained in this study by using the MTT test, the biogenic silver nanoparticles (AgNp-Bio) presented dose-dependent toxicity in relation to the HeLa cells. Accordingly, a study by Mnkandhala and collaborators (2018) using *Plasmodium falciparum* – parasite of the phylum Apicomplexa as well as *Toxoplasma* – demonstrated that the treatment with AgNp has a more pronounced toxic effect on the parasite than the HeLa cells. Rahul and collaborators (2015), in turn, found that microbial pigments associated with AgNp did not present significant toxicity in breast cancer cells (MCF7) as well as in HeLa cells.

Furthermore, a study by Kim and collaborators (2012) revealed that over a period of 24 hours, the cytotoxic effect in HeLa cells proved dose-dependent and size-dependent. Thus, the size of nanoparticles is regarded as a significant contributing factor to toxicity since smaller nanoparticles have more pronounced toxic effects due to a larger surface area (Oberdörster et al., 2005). In addition, many studies did not find toxic effects in different cultures of human cells with the

incubation of silver nanoparticles of diameters from 6 to 80nm (Hussain et al., 2005; Asharani et al., 2008; Singh et al., 2010; Lu et al., 2010; Foldbjerg et al., 2011). As our study found a mean size of 69.0nm for the silver nanoparticles, we believe it to be a factor to justify the low toxicity of this nanomaterial in HeLa cells.

Therefore, in addition to advantage of low toxicity of AgNp on HeLa cells, this nanomaterial is also highlighted for its antiviral (Shrivastava et al., 2007; Durán, et al., 2016), anti-inflammatory (Dai et al. 2016; Pourali et al. 2016; Zhang et al. 2016; Gonzalez-Carter et al. 2017), antimicrobial (Adair et al., 2010; Scandorieiro et al., 2016), and antiparasitic activities (Gaafar et al., 2014; Fanti et al., 2018; Isaac-Marquez et al., 2018). Our study revealed that the AgNp-Bio promoted a significant decrease in the number of tachyzoites adhered to the HeLa cells as well as the number of infected cells in addition to having fostered an inhibition up to 94% in the parasite intracellular proliferation. The images in Figure 6 corroborate these data through light microscopy with reduced parasitic vacuoles and tachyzoites in the cells treated with AgNp-Bio.

In this context, the in vitro study by Rahul and collaborators (2015) also corroborates our data by demonstrating that prodigiosine – a bioactive microbial pigment – associated with phytosynthetic AgNp inhibit the growth of *P. falciparum* and *Trypanosoma brucei* gambiense in vitro. The authors also found a significant reduction in the values of IC50 for both parasites (2.7 to 3.6 times) without an increase in cytotoxicity in the cells.

Specifically regarding the protozoan *T. gondii*, a study carried out by Gaafar and collaborators (2014) demonstrated that the AgNp had an anti-*Toxoplasma* in vivo effect since all animals that received this compound had a significant reduction in parasitic load in the liver and spleen in relation to the control group – infected animals and without treatment. Furthermore, this treatment caused the paralysis of the parasite and deformations in the tachyzoites with the formation of multiple irregular grooves and disorder of the conoid observed through scanning electron microscopy.

Additionally, a study by Adeyemi and collaborators (2017) assessed the anti-*T.gondii* action of gold, silver and platinum nanoparticles and detected a

decrease in the parasite invasion and replication, which suggests that the treatment interrupts the replication of *T. gondii* through unknown mechanisms. Jointly, the antiparasitic actions promoted by the AgNp are consistent with the study by Yah and Simate (2015) on the antimicrobial actions of these nanoparticles and stimulate the investigation of AgNp as a promising anti-*Toxoplasma* alternative.

Although the parasitic invasion processes prevent in this study are yet to be revealed, it is known that the AgNp can act by causing deformations and disorder in the plasmatic membrane as well as damages in the ultrastructures, which interferes in the infectivity potential of parasites (Gaafar et al., 2014; Fanti et al., 2018). Additionally, according to the literature, it is known that the AgNp can be stored inside mitochondria, thus hampering the synthesis of adenosine triphosphate (ATP) (Zheng et al., 2008) as well as causing damages to the mitochondrial membrane (Adeyemi et al., 2017). It was also demonstrated that the *T. gondii* has the leucine aminopeptidase (LAP) enzyme (Jia et al., 2010), which has fundamental roles on physiological processes in the parasite, such as catabolism of proteins and modulation of genic expression (Matsui et al., 2006).

Zheng and collaborators (2015) demonstrated its importance by studying knockout parasites of this enzyme and finding a reduction in intracellular invasion, infection, and proliferation. It is known that the AgNp are able to interact with LAP fragmenting its protein structure and leading to a loss of function (Mnkdhala et al., 2018) and consequently able to impair the parasitic activity of *T. gondii*. We believe these to be the main reasons pointed out in our data regarding both the adherence and the indices of parasite intracellular infection and proliferation.

The fact that the AgNp-Bio interfere in the mitochondrial membrane can contribute to the increase in oxidative stress promoting enhanced ROS and free radicals, such as NO (Lodge and Descoteaux, 2006; Misawa and Takahashi, 2011; Manke et al., 2013). However, our study found that the treatment with AgNp-Bio decreased NO production and did not alter ROS production. Thus, by knowing that the AgNp is able to diffuse in cellular membranes (Busch et al., 2011) and associating it with the results of low production of the molecules necessary to the death of intracellular pathogens, we can infer that the action of the silver nanoparticles is more direct in the parasite. A similar study conducted by our own

group found a reduced proliferation of amastigotes of *Leishmania amazonensis*, but without the induction of inflammatory mediator synthesis (Fanti et al., 2018). Nonetheless, the heterogeneity of the in vitro cellular models generates a great diversity of results in the literature regarding the effects of the AgNp for the production of ROS and NO.

Regarding the cytokines, Stepkowsk and collaborators (2014) demonstrated that the treatment using AgNp generated an inducibility of the NF- κ B signaling in lung cancer cells (A549) approximately five times lower than in liver cancer cells (HepG2), which proves that cellular type influences the cellular response mediated by the NF- κ B. This is clear in the case of *T. gondii* in the studies by Butcher and collaborators (2001) demonstrating that the *T. gondii* tachyzoites obstructs the NF- κ B activation route preventing its translocation to the core and allowing the parasite to invade the macrophages without triggering the induction of pro-inflammatory cytokines, such as IL-12 and TNF- α .

Such interference caused by the parasite was also found by Shapira and collaborators (2002) in fibroblasts, which proves that the *T. gondii* is able to interfere in the NF- κ B route escaping the immune system and fostering its survival inside the host cell. In contrast, Kim and collaborators (2001) concluded that HeLa cells infected with *T. gondii* produce a higher amount of IL-8 (chemokine that help the migration of leukocytes, especially neutrophils) due to the NF- κ B activation, which is in accordance with our results. In addition, some authors demonstrated the regulating role of NO regarding the IL-8 by stimulating its production, while the NO inhibition decreases its production (Villarete et al., 1995; Andrew et al., 1995), which was proven in our results that show reduced NO in the treatment using AgNp-Bio, thus a reduction in IL-8 is expected.

Furthermore, aiming at overcoming the anti-inflammatory action triggered by the parasite, the AgNp can have an important role in the anti-inflammatory field (Zhang et al., 2016). In this context, Wong and collaborators (2009) use in vivo and in vitro models to obtain evidence on the anti-inflammatory properties of AgNPs and found that these nanoparticles are able to reduce the quantity of inflammatory markers, which was also corroborated by David and collaborators (2014), who reported an ability of AgNp-Bio to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines

in an immortalized lineage of keratinocytes (HaCaT) as well as decrease the levels of edema in in vivo experiments.

It is known that *Toxoplasma* is highly successful parasite that establishes a chronic infection along its life by carefully regulating the immune activation and effector mechanisms of the host cell. Consequently, *T. gondii* has the ability to soften or inciting the immune response of the host through effector proteins (Melo et al., 2011). Thus, it is possible to infer that the combinations of these effectors present in certain *T. gondii* strain work to maintain an optimum parasitic load in different hosts to guarantee the parasite transmission. However, even though an important advance has been reached over the last decade regarding the understanding on the action of *T. gondii* to modulate immune responses, the exact mechanisms mediated by the cytokines as an initial response to inflammation upon infection with *T. gondii* are yet to be further explored.

Conclusion

Considering all the above-mentioned remarks, our study was pioneer at highlighting the anti-*T. gondii* action of biogenically synthesized. Our results indicate that these nanoparticles proved able to reduce the parasite proliferation without producing ROS or NO. In addition, we found that the AgNp-Bio had the ability to immunomodulate the IL-8. Therefore, the data found in this study have proved relevant for presenting promising results as a therapeutic alternative for toxoplasmosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adair, JH, Parette, MP, Altinoglu, EI, Kester, M (2010) Nanoparticulate alternatives for drug delivery. *ACS nano* **4**, 4967-4970. doi: 10.1021/nn102324e.

Adeyemi, OS, Sulaiman, FA (2015) Evaluation of metal nanoparticles for drug delivery systems. *Journal of biomedical research* **29**, 145. doi: 10.7555/JBR.28.20130096.

Adeyemi, OS, Murata, Y, Sugi, T, Kato, K (2017) Inorganic nanoparticles kill *Toxoplasma gondii* via changes in redox status and mitochondrial membrane potential. *International journal of nanomedicine* **12**, 1647. doi: 10.2147/IJN.S122178.

Adeyemi, OS, Molefe, NI, Awakan, OJ, Nwonuma, CO, Alejlowo, OO, Olaolu, T, Maimako, RF, Suganuma, K han, Y, Kato, K (2018) Metal nanoparticles restrict the growth of protozoan parasites. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* **14**, 1-9. doi: 10.1080/21691401.2018.1489267.

Alday, PH, Bruzual, I, Nilsen, A, Pou, S, Winter, R, Mamoun, CB, Riscoe, MK, Doggett, JS (2017) Genetic Evidence for Cytochrome b Qi Site Inhibition by 4 (1H)-quinolone-3-diarylethers and Antimycin in *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **61**, e01866-16. doi: 10.1128/AAC.01866-16.

Allahverdiyev, AM, Abamor, ES, Bagirova, M, Ustundag, CB, Kaya, C, Kaya, F, Rafailovich, M (2011) Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *International journal of Nanomedicine* **6**, 2705. doi: 10.2147/IJN.S23883.

Anbazhagan, S, Azeez, S, Morukattu, G, Rajan, R, Venkatesan, K, Thangavelu, KP (2017) Synthesis, characterization and biological applications of mycosynthesized silver nanoparticles. *3 Biotech* **7**, 333. doi: 10.1007/s13205-017-0961-9.

Andrew, PJ, Harant, H, Lindley, IJD (1995) Nitric oxide regulates IL-8 expression in melanoma cells at the transcriptional level. *Biochemical and biophysical research communications* **214**, 949-956. doi: 10.1006/bbrc.1995.2378.

Arokiyaraj, S, Vincent, S, Saravanan, M, Lee, Y, Oh, YK, Kim, KH (2017) Green synthesis of silver nanoparticles using Rheum palmatum root extract and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* **45**, 372-379. doi: 10.3109/21691401.2016.1160403.

Asharani, PV, Wu, YL, Gong, Z, Valiyaveetil, S (2008) Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology* **19**, 255102. doi: 10.1088/0957-4484/19/25/255102.

Assolini, JP, Concato, VM, Gonçalves, MD, Carloto, ACM, Conchon-Costa, I, Pavanelli, WR, Melanda, FN, Costa, IN (2017) Nanomedicine advances in toxoplasmosis: diagnostic, treatment, and vaccine applications. *Parasitology research* **116**, 1603-1615. doi: 10.1007/s00436-017-5458-2.

Atilla, A, Aydin, S, Demirdöven, AN, Kiliç, SS (2015). Severe toxoplasmic hepatitis in an immunocompetent patient. *Japanese journal of infectious diseases* **68**, 407-409. doi: 10.7883/yoken.JJID.2014.422.

Barbosa, BF, Gomes, AO, Ferro, EAV, Napolitano, DR, Mineo, JR, Silva, NM (2012) Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in both *in vitro* and *in vivo* experimental models. *Veterinary parasitology* **187**, 44-52. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.12.039.

Bhardwaj, R, Saudagar, P, Dubey, VK (2012) Nanobiosciences: a contemporary approach in antiparasitic drugs. *Molecular and Cellular Pharmacology* **4**, 97-103. doi: 10.4255/mcpharmacol.12.11.

Busch, W, Bastian, S, Trahorsch, U, Iwe, M, Kühnel, D, Meibner, T, Springer, A, Gelinsky, M, Richter, V, Ikonomidou, C, Potthoff, A, Lehmann, I, Schirmer, K (2011) Internalisation of engineered nanoparticles into mammalian cells *in vitro*: influence of cell type and particle properties. *Journal of Nanoparticle Research* **13**, 293–310. doi: 10.1007/s11051-010-0030-3.

Butcher, BA, Kim, L, Johnson, PF, Denkers, EY (2001) *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by

preventing nuclear translocation of the transcription factor NF- κ B. *The Journal of Immunology* **167**, 2193-2201. doi: 10.4049/jimmunol.167.4.2193.

Butkus, MA, Labare, MP, Starke, JA, Moon, K, Talbot, M (2004) Use of aqueous silver to enhance inactivation of coliphage MS-2 by UV disinfection. *Applied and environmental microbiology* **70**, 2848-2853. doi: 10.1128/AEM.70.5.2848-2853.2004.

Castanheira, L, De Souza, DLN, Silva, RJ, Barbosa, B, Mineo, JR, Tudini, KA, Rodrigues, R, Ferro, EV, De Melo Rodrigues, V (2015) Insights into anti-parasitism induced by a C-type lectin from *Bothrops pauloensis* venom on *Toxoplasma gondii*. *International journal of biological macromolecules* **74**, 568-574. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.11.035.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Toxoplasmosis (Toxoplasma infection). Website: <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/epi.html> (accessed 12 May 2018).

Dai, X, Guo, Q, Zhao, Y, Zhang, P, Zhang, T, Zhang, X, Li, C (2016) Functional silver nanoparticle as a benign antimicrobial agent that eradicates antibiotic-resistant bacteria and promotes wound healing. *ACS applied materials & interfaces* **8**, 25798-25807. doi: 10.1021/acsami.6b09267.

Das, VL, Thomas, R, Varghese, RT, Soniya, EV, Mathew, J, Radhakrishnan, EK (2014) Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS 11 isolated from industrialized area. *Biotech* **4**, 121-126. doi: 10.1007/s13205-013-0130-8.

David, L, Moldovan, B, Vulcu, A, Olenic, L, Perde-Schrepler, M, Fischer-Fodor, E, Florea, A, Crisan, M, Chiorean, I, Clichici, S, Filip GA (2014) Green synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of silver nanoparticles using European black elderberry fruits extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **122**, 767-777. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.08.018.

Durán, N, Durán, M, De Jesus, MB, Seabra, AB, Fávaro, WJ, Nakazato, G (2016) Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **12**, 789-799. doi: 10.1016/j.nano.2015.11.016.

Durán, N, Marcato, PD, Alves, OL, De Souza, GI, Esposito, E (2005) Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of nanobiotechnology* **3**, 8. doi: 10.1186/1477-3155-3-8.

Durán, N, Marcato, PD, De Souza, GI, Alves, OL, Esposito, E (2007) Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal of biomedical nanotechnology* **3**, 203-208. doi: 10.1166/jbn.2007.022.

Fanti, JR, Tomiotto-Pellissier, F, Miranda-Sapla, MM, Cataneo, AHD, De Jesus Andrade, CGT, Panis, C, Rodrigues, JHS, Wowk, PF, Kuczera, D, Costa, IN, Nakamura, CV, Nakazato, G, Duran, N, Pavanelli, WR, Conchon-Costa, I (2018) Biogenic silver nanoparticles inducing *Leishmania amazonensis* promastigote and amastigote death *in vitro*. *Acta tropica* **178**, 46-54. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.10.027.

Foldbjerg, R, Dang, DA, Autrup, H (2011) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of toxicology* **85**, 743-750. doi: 10.1007/s00204-010-0545-5.

Gaafar, MR, Mady, RF, Diab, RG, Shalaby, TI (2014) Chitosan and silver nanoparticles: promising anti-*Toxoplasma* agents. *Experimental parasitology* **143**, 30-38. doi: 10.1016/j.exppara.2014.05.005.

Girilal, M, Fayaz, AM, Elumalai, LK, Sathiyaseelan, A, Gandhiappan, J, Kalaichelvan, PT (2018) Comparative Stress Physiology Analysis of Biologically and Chemically Synthesized Silver Nanoparticles on *Solanum Lycopersicum* L. *Colloid and Interface Science Communications* **24**, 1-6. doi: 10.1016/j.colcom.2018.02.005.

Girilal, M, Krishnakumar, V, Poornima, P, Fayaz, AM, Kalaichelvan, PT (2015) A comparative study on biologically and chemically synthesized silver nanoparticles induced Heat Shock Proteins on fresh water fish *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere* **139**, 461-468. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.08.005.

Gonzalez-Carter, DA, Leo, BF, Ruenraroengsak, P, Chen, S, Goode, AE, Theodorou, IG, Chung, KF, Carzaniga, R, Shaffer, MSP, Ryan, MP, Porter, AE (2017) Silver nanoparticles reduce brain inflammation and related neurotoxicity

through induction of H₂S-synthesizing enzymes. *Scientific reports* **7**, 42871. doi: 10.1038/srep42871.

Gurunathan, S, Han, JW, Kwon, DN, Kim, JH (2014) Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale research letters* **9**, 373. doi: 10.1186/1556-276X-9-373.

Hussain, SM, Hess, KL, Gearhart, JM, Geiss, KT, Schlager, JJ (2005) *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro* **19**, 975-983. doi: 10.1016/j.tiv.2005.06.034.

Isaac-Márquez, AP, Talamás-Rohana, P, Galindo-Sevilla, N, Gaitan-Puch, SE, Díaz-Díaz, NA, Hernández-Ballina, GA, Lezama-Dávila, CM (2018) Decanethiol functionalized silver nanoparticles are new powerful leishmanicidals *in vitro*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **34**, 38. doi: 10.1007/s11274-018-2420-0.

Jia, H, Nishikawa, Y, Luo, Y, Yamagishi, J, Sugimoto, C, Xuan, X (2010) Characterization of a leucine aminopeptidase from *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology* **170**, 1-6. doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.11.005.

Jiao, Q, Li, L, Mu, Q, Zhang, Q (2014) Immunomodulation of nanoparticles in nanomedicine applications *BioMed research international*, **2014**. doi: 10.1155/2014/426028.

Jones, HW, Mc Kusick, VA, Harper, PS, Wu, KD (1971). George Otto Gey (1899–1970): the HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstetrics & Gynecology* **38**, 945-949.

Khalil, NM, Do Nascimento, TCF, Casa, DM, Dalmolin, LF, De Mattos, AC, Hoss, I, Romano, MA, Mainardes, RM (2013) Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA–PEG blend nanoparticles after oral administration in rats. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **101**, 353-360. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.06.024.

Khanna, P, Ong, C, Bay, B, Baeg, G (2015) Nanotoxicity: an interplay of oxidative stress, inflammation and cell death. *Nanomaterials* **5**, 1163-1180. doi: 10.3390/nano5031163.

- Kim, J, Oh, YK, Kim, YJ, Cho, S, Ahn, MH, Cho, YJ** (2001) Nuclear factor-kappa B plays a major role in the regulation of chemokine expression of HeLa cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. *Parasitology research* **87**, 758-763. doi: 10.1007/s004360100447.
- Kim, TH., Kim, M, Park, HS, Shin, US, Gong, MS, Kim, HW** (2012) Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *Journal of biomedical materials research Part A*, **100**, 1033-1043. doi: 10.1002/jbm.a.34053.
- Krueger, WS, Hilborn, ED, Converse, RR, Wade, TJ** (2014) Drinking water source and human *Toxoplasma gondii* infection in the United States: a cross-sectional analysis of NHANES data. *BMC Public Health* **14**, 711. doi: 10.1186/1471-2458-14-711.
- Lodge, R, Diallo, TO, Descoteaux, A** (2006) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cellular microbiology* **8**, 1922-1931. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00758.x.
- Lu, W, Senapati, D, Wang, S, Tovmachenko, O, Singh, AK, Yu, H, Ray, PC** (2010) Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes. *Chemical physics letters* **487**, 92-96. doi: 10.1016/j.cplett.2010.01.027.
- Lucey, BP, Nelson-Rees, WA, Hutchins, GM** (2009) Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Archives of pathology & laboratory medicine* **133**, 1463-1467. doi: 10.1043/1543-2165-133.9.1463.
- Manke, A, Wang, L, Rojanasakul, Y** (2013) Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed research international*, **2013**. doi: 10.1155/2013/942916.
- Matsui, M, Fowler, JH, Walling, LL** (2006) Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biological Chemistry* **12**, 1535–1544. doi: 10.1515/BC.2006.191.
- Melo, MB, Jensen, KD, Saeij, JP** (2011) *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends in parasitology* **27**, 487-495. doi: 10.1016/j.pt.2011.08.001.

Misawa, M, Takahashi, J (2011) Generation of reactive oxygen species induced by gold nanoparticles under x-ray and UV Irradiations. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **7**, 604-614. doi: 10.1016/j.nano.2011.01.014.

Mnkandhla, D, Marwijk, JV, Hoppe, H, Wilhelmi, BS, Whiteley, CG (2018) *In vivo*; *In vitro* Interaction of Silver Nanoparticles with Leucine Aminopeptidase from Human and *Plasmodium falciparum*. *Journal of nanoscience and nanotechnology* **18**, 865-871. doi: 10.1166/jnn.2018.13966.

Montazeri, M, Sharif, M, Sarvi, S, Mehrzadi, S, Ahmadpour, E, Daryani, A (2017) A systematic review of *in vitro* and *in vivo* activities of anti-Toxoplasma drugs and compounds (2006–2016). *Frontiers in microbiology* **8**, 25. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00025>.

Mosmann, T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**, 55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Nasrollahi, A, Pourshamsian, KH, Mansourkiaee, P (2011) Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. *International Journal of Nano Dimension* **1**, 233-239. doi: 10.7508/IJND.2010.03.007.

Oberdörster, G, Oberdörster, E, Oberdörster, J (2005) Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspective* **113**, 823–839. doi: 10.3390/nano5031163.

Park, S, Ko, YS, Lee, SJ, Lee, C, Woo, K, Ko, G (2018) Inactivation of influenza A virus via exposure to silver nanoparticle-decorated silica hybrid composites. *Environmental Science and Pollution Research* **25**, 27021-27030. doi: 10.1007/s11356-018-2620-z.

Petersen, E (2007) Toxoplasmosis. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* **12**, 214-223. doi: 10.1016/j.siny.2007.01.011.

Picoli, SU, Durán, M, Andrade, PF, Duran, N (2016) Silver nanoparticles/silver chloride (Ag/AgCl) synthesized from *Fusarium oxysporum* acting against *Klebsiella*

pneumoniae carbapenemase (KPC) and extended spectrum beta-lactamase (ESBL). *Front Nanosci Nanotech* **2**, 107-110. doi: 10.15761/FNN.1000117.

Pourali, P, Yahyaei, B (2016) Biological production of silver nanoparticles by soil isolated bacteria and preliminary study of their cytotoxicity and cutaneous wound healing efficiency in rat. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **34**, 22-31. doi: 10.1016/j.jtemb.2015.11.004.

Rahul, S, Chandrashekhar, P, Hemant, B, Bipinchandra, S, Mouray, E, Grellier, P, Satish, P (2015) *In vitro* antiparasitic activity of microbial pigments and their combination with phytosynthesized metal nanoparticles. *Parasitology international* **64**, 353-356. doi: 10.1016/j.parint.2015.05.004.

Riehemann, K, Schneider, SW, Luger, TA, Godin, B, Ferrari, M, Fuchs, H (2009) Nanomedicine: challenge and perspectives. *Angewandte Chemie: International Edition* **48**, 872–897. doi: 10.1002/anie.200802585.

Robert-Gangneux, F, Dardé, ML (2012) Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews* **25**, 264–296. doi: 10.1128/CMR.05013-11.

Sanfelice, RA, Machado, LF, Bosqui, LR, Miranda-Sapla, MM, Tomiotto-Pellissier, F, De Alcântara Dalevedo, G, Ioris, D, Reis, GF, Panagio, LA, Navarro, IT, Bordignon, J, Conchon-Costa, I, Pavanelli, WR, Almeida, RS, Costa, IN (2017) Activity of rosuvastatin in tachyzoites of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in HeLa cells. *Experimental parasitology* **181**, 75-81. doi: 10.1016/j.exppara.2017.07.009.

Sanguiñedo, P, Fratila, RM, Estevez, MB, De La Fuente, JM, Grazú, V, Alborés, S (2018) Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using fungi and their antibacterial activity. *Nano Biomedicine and Engineering* **10**, 165-173. doi: 10.5101/nbe.v10i2.p165-173.

Scandorieiro, S, De Camargo, LC, Lancheros, CA, Yamada-Ogatta, SF, Nakamura, CV, De Oliveira, AG, Andrade, CGTJ, Duran, N, Nakazato, G, Kobayashi, RK (2016) Synergistic and additive effect of oregano essential oil and

biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. *Frontiers in microbiology* **7**, 760. doi: 10.3389/fmicb.2016.00760.

Sepulveda-Arias, JC, Veloza, LA, Mantilla-Muriel, LE (2014). Anti-*Toxoplasma* activity of natural products: a review. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, **9**, 186-194.

Shapira, S, Speirs, K, Gerstein, A, Caamano, J, Hunter, CA (2002) Suppression of NF- κ B activation by infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of infectious diseases* **185**, S66-S72. doi: 10.1086/338000.

Sharma, V, Kaushik, S, Pandit, P, Dhull, D, Yadav, JP, Kaushik, S (2019) Green synthesis of silver nanoparticles from medicinal plants and evaluation of their antiviral potential against chikungunya virus. *Applied microbiology and biotechnology* **103**, 881-891. doi: 10.1007/s00253-018-9488-1.

Shrivastava, S, Bera, T, Roy, A, Singh, G, Ramachandrarao, P, Dash, D (2007) Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, **18**, 225103. doi: 10.1088/0957-4484/18/22/225103.

Singh, S, D'Britto, V, Prabhune, AA, Ramana, CV, Dhawan, A, Prasad, BLV (2010) Cytotoxic and genotoxic assessment of glycolipid-reduced and-capped gold and silver nanoparticles. *New Journal of Chemistry* **34**, 294-301. doi: 10.1039/B9NJ00277D.

Stępkowski, TM, Brzóška, K, Kruszewski, M (2014) Silver nanoparticles induced changes in the expression of NF- κ B related genes are cell type specific and related to the basal activity of NF- κ B. *Toxicology in vitro* **28**, 473-478. doi: 10.1016/j.tiv.2014.01.008.

Sutterland, AL, Fond, G, Kuin, A, Koeter, MWJ, Lutter, R, Van Gool, T, Yolken, R, Szoke, A, Leboyer, M, De Haan, L (2015) Beyond the association *Toxoplasma gondii* in schizophrenia, bipolar disorder, and addiction: systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatrica Scandinavica* **132**, 161-179. doi: 10.1111/acps.12423.

Tomiotto-Pellissier, F, Alves, DR, Miranda-Sapla, MM, de Moraes, SM, Assolini, JP, da Silva Bortoleti, BT, Gonçalves, MD, Cataneo, AHD, Kian, D, Madeira, TB, Yamauchi, LM, Nixdorf, SL, Costa, IN, Conchon-Costa, I, Pavanelli, WR (2018) *Caryocar coriaceum* extracts exert leishmanicidal effect acting in promastigote forms by apoptosis-like mechanism and intracellular amastigotes by Nrf2/HO-1/ferritin dependent response and iron depletion: Leishmanicidal effect of *Caryocar coriaceum* leaf extracts. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **98**, 662-672. doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.083.

Torres-Sangiao, E, Holban, A, Gestal, M (2016) Advanced nanobiomaterials: vaccines, diagnosis and treatment of infectious diseases. *Molecules* **21**, 867. doi: 10.3390/molecules21070867.

Velhal, SG, Kulkarni, SD, Latpate, RV (2016) Fungal mediated silver nanoparticle synthesis using robust experimental design and its application in cotton fabric. *International Nano Letters* **6**, 257-264. doi: 10.1007/s40089-016-0192-9.

Villarete, LH, Remick, DG (1995) Nitric oxide regulation of IL-8 expression in human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* **211**, 671-676. doi: 10.1006/bbrc.1995.1864.

Wong, KK, Cheung, SO, Huang, L, Niu, J, Tao, C, Ho, CM, Che, CM, Tam PKH (2009). Further evidence of the anti-inflammatory effects of silver nanoparticles. *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery* **4**, 1129-1135. doi: 10.1002/cmdc.200900049.

Yah, CS, Simate, GS (2015) Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* **23**, 43. doi: 10.1186/s40199-015-0125-6.

Zhang, XF, Liu, ZG, Shen, W, Gurunathan, S (2016) Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International journal of molecular sciences* **17**, 1534. doi: 10.3390/ijms17091534.

Zheng, J, Wu, X, Wang, M, Ran, D, Xu, W, Yang, J (2008) Study on the interaction between silver nanoparticles and nucleic acids in the presence of

cetyltrimethylammonium bromide and its analytical application. *Talanta* **74**, 526-532. doi: 10.1016/j.talanta.2007.06.014.

Zheng, J, Jia, H, Zheng, Y (2015) Knockout of leucine aminopeptidase in *Toxoplasma gondii* using CRISPR/Cas9. *International journal for parasitology* **45**, 141-148. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.09.003.

5. CONCLUSÃO GERAL

Assim, segundo nossos resultados, que são pioneiros, demonstrou-se que, além de não apresentar citotoxicidade significativa para células HeLa em baixas concentrações, as nanopartículas tiveram tanto capacidade de imunomodular IL-8, assim como reduzir a adesão, infecção e proliferação do parasito sem a produção de ROS e NO. Isso reforça a necessidade de explorar o potencial de AgNp-Bio dentro da esfera nanomédica e em estudos com *T. gondii*, uma vez que apresentam resultados promissores como alternativa terapêutica na toxoplasmose.

ANEXOS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 88/2017

Londrina, 03 de Julho de 2017.

Prezado (a) professor (a)


Certificamos que o projeto intitulado: "**Produção de antígeno, sorodiagnóstico e bioensaio para o diagnóstico de toxoplasma gondii e neospora caninum.**" protocolo CEUA nº4153.2017.55 sob a responsabilidade de **Roberta Lemos Freire**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), 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), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **30/05/2017**.

O objetivo é manter cepas de *Toxoplasma gondii*, em camundongos, para a produção de antígenos a serem utilizados no sorodiagnóstico da toxoplasmose; e realizar o bioensaio, inoculação de material biológico proveniente de abortamentos em animais de produção, para o diagnóstico de toxoplasmose e/ou neosporose. Grau de invasividade=2

Vigência do Projeto	01/08/2017 a 31/07/2019
Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	576
Peso/Idade	25g / Jovem
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério do CCB - Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Líquido peritoneal, sangue, cérebro.

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.


 Profa. Dra Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr (a). Roberta Lemos Freire

Responsável pelo projeto
 Departamento DMVP

C/C para a Clínica Veterinária
 C/C para a Chefia do Depto. DMVP
 C/C para a Direção de Centro do CCA