



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO - UFTM**  
Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia - PPGMTI

ROBERTO AUGUSTO PEREIRA DE SOUSA

Efeito imunomodulador da saliva de *Rhodnius prolixus* na  
infecção intestinal crônica por *Toxoplasma gondii* em camundongos C57BL/6

Uberaba - MG

2020

ROBERTO AUGUSTO PEREIRA DE SOUSA

Efeito imunomodulador da saliva de *Rhodnius prolixus* na  
infecção intestinal crônica por *Toxoplasma gondii* em camundongos C57BL/6

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia, área de concentração “Parasitologia e Imunologia Aplicadas”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes

UBERABA-MG

2020

**Catálogo na fonte:**  
**Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

S698e Sousa, Roberto Augusto Pereira de  
Efeito imunomodulador da saliva de *Rhodnius prolixus* na infecção intestinal crônica por *Toxoplasma gondii* em camundongos C57BL/6/ Roberto Augusto Pereira de Sousa. -- 2020.  
64 f. : il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Infectologia) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2020  
Orientadora: Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Doença de Crohn. 3. Proteínas e peptídeos salivares. 4. Imunidade nas mucosas. 5. Fatores imunológicos. I. Gomes, Angelica de Oliveira. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.34-002

Dedico este trabalho aos meus pais Alessandra e José Roberto por terem me dado carinho, força e incentivo para chegar até aqui. À minha irmã Fernanda por sempre me entender e por me incentivar em todos os meus projetos. Aos meus avós, Dalva, Maria Rosa e João pelo carinho e por me ensinar desde de criança a importância de estudar. À minha madrinha Alexandar por ter sido como uma segunda mãe sempre me encorajando. À minha prima Ana Maria, a qual considero minha irmã e tenho um grande carinho por ela. Por fim, dedico a este trabalho a todos professores da minha vida acadêmica que me ajudaram a desenvolver como profissional e ser humano.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, a Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes, por ter me recebido na universidade e no seu grupo de pesquisa. Por entender minhas dificuldades e sempre me incentivar a melhorar. Pelos ensinamentos. Por ser compreensiva perante aos meus erros e paciente aos corrigi-los. Por incentivar a amar a pesquisa independente das dificuldades. Agradeço imensamente por ser uma orientadora incrível, te considero um exemplo de profissional, professora e pesquisadora.

Aos professores Dr. Carlo José Freire de Oliveira e Dr. Virmondes Rodrigues Junior por terem aberto a porta do laboratório de imunologia. Pelos ensinamentos e por contribuir para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes por ter aceitado participar da minha qualificação, pelos ensinamentos e pela ajuda no projeto.

Ao professor Dr. Marcos Vinicius da Silva, pela paciência, incentivo, por ter ajudado na dosagem de citocinas por CBA e na doação de insumos.

Às técnicas de laboratório Carol e Ms. Lívia, por abrirem o espaço do laboratório e me ajudarem sempre que for possível.

À Ms. Paula Tatiana por me socorrer e me ajudar nos primeiros passos no laboratório e ao Ms. Rafael Obata por ter me ensinado a técnica de extração de glândula salivar de barbeiro.

Às técnicas do insetário da UFTM Ms. Isadora e Ms. Flávia por me ajudarem nas solicitações de barbeiros.

Aos alunos do nosso grupo Gabriela, Joaquim, Carlos, Beatriz e Ana Laura por me ajudarem e ter permitido que os acompanhassem contribuindo para minha ambientação no laboratório.

Ao pessoal do “fundo” pela amizade, pelos momentos de descontração, de refúgio, principalmente à Ms. Priscilla Elias e Juliana Madeira.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia por ter contribuído para realização de parte deste projeto. Principalmente à Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro e Dra. Bellisa de Freitas Barbosa por fornecerem estrutura de laboratório e material de consumo para os experimentos.

À Ms. Rafaela José da Silva, Ms. Thádia Evelyn Araújo, Ms. Iliana Claudia Balga Milian e Jean Henrique Nunes de Paula por ajudarem na coleta de material biológico e eutanásia.

Ao Jean Henrique Nunes de Paula e Dr. Murilo Vieira da Silva por ajudarem no tratamento e no registro de escores clínicos dos animais.

À Rede de biotérios da UFU, REBIR pelo suporte com infraestrutura para realização dos experimentos com animais.

E por fim, à CAPES, CNPQ e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 BARREIRA INTESTINAL.....	11
1.2 MICROBIOTA INTESTINAL.....	15
1.3 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS .....	16
<b>1.3.1 Doença de Crohn</b> .....	<b>17</b>
1.4 <i>Toxoplasma gondii</i> E TOXOPLASMOSE .....	19
1.5 INFECÇÃO POR <i>T. gondii</i> COMO MODELO PARA AS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS .....	21
1.6 SALIVA DE TRIATOMÍNEO COMO FORMA DE TRATAMENTO .....	23
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>25</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
3.1 OBJETIVO GERAL:.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	26
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
4.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS.....	27
4.2 COLETA, ARMAZENAMENTO E DETERMINAÇÃO PROTEICA DO EXTRATO DE GLÂNDULA SALIVAR (EGS) DE <i>R. prolixus</i> .....	27
4.3 OBTENÇÃO DOS CISTOS DE <i>T. gondii</i> .....	28
4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	28
4.5 QUANTIFICAÇÃO PARASITÁRIA EM MACERADO DE CÉREBRO .....	30
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO ( <i>CYTOMETRIC BEAD ARRAY</i> – CBA).....	30
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>

5.1 VARIAÇÃO MÉDIA DIÁRIA DE ESCORES CLÍNICOS DE MORBIDADE .....	32
5.2 SOMA TOTAL DOS ESCORES DE MORBIDADE NOS 23 DIAS DE TRATAMENTO COM SALIVA.....	33
5.3 EFICÁCIA DO TRATAMENTO COM EGS NA REDUÇÃO DE PERDA DE PESO DURANTE A INFECÇÃO .....	34
5.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM EGS NA SOBREVIVÊNCIA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	36
5.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM EGS NO COMPRIMENTO INTESTINAL.....	37
5.6 EFEITO DO TRATAMENTO COM EGS NA CONTAGEM DE CISTOS EM MACERADOS DE CÉREBRO .....	38
5.7 PRODUÇÃO DE CITOCINAS SÉRICAS .....	39
5.8 ANIMAIS ALTO PRODUTORES DE CITOCINAS SÉRICAS .....	40
5.9 PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO INTESTINO .....	42
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>66</b>



## RESUMO

Camundongos C57BL/6 ao serem infectados oralmente por *Toxoplasma gondii* desenvolvem uma inflamação intestinal acentuada semelhante à Doença de Crohn, constituindo um bom modelo de estudo para esta doença. Atualmente, faltam medicamentos que tratem com eficiência e sejam acessíveis para os pacientes portadores da Doença de Crohn. Apesar disso, a saliva de insetos hematófagos tem se mostrado um bom imunomodulador reduzindo a inflamação exacerbada. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos imunomoduladores da saliva do artrópode *Rhodnius prolixus*, no tratamento de uma inflamação intestinal causada por infecção oral por *Toxoplasma gondii*. Para este propósito, foram criados 3 grupos de animais, contendo 10 camundongos C57BL/6 em cada grupo. O grupo controle recebeu 100µL de tampão fosfato-salino (PBS) e os outros foram tratados com extrato de glândula salivar (EGS), na quantidade de 10µg ou 30µg, ambos diluídos em 100µL de PBS. Todos os grupos receberam seus respectivos tratamentos via intraperitoneal. Os animais foram tratados com EGS ou solução tampão fosfato-salino durante 23 dias e a infecção por *T. gondii* ocorreu por gavagem, dois após o início do tratamento. Durante o tratamento, os animais foram pesados diariamente, sendo anotados os escores clínicos de cada animal. Ao final deste período, os animais foram eutanasiados. Para contagem do número cistos, foi coletado o encéfalo, ademais foi medido o comprimento do intestino delgado. Foi coletado também, fragmentos do intestino e sangue para realizar dosagem de citocinas por citometria de fluxo. Os resultados demonstram que a saliva agiu como um bom imunomodulador da inflamação exacerbada causada por *T. gondii* no intestino delgado. O tratamento diminuiu os escores clínicos do grupo tratado com a maior concentração de EGS. Observou-se também, que os animais tratados com a maior concentração de EGS perderam menos peso em relação aos demais grupos. O tratamento com a maior concentração de EGS promoveu maiores taxas de sobrevivência e comprimento intestinal, embora sem diferença estatística entre os grupos. A maior quantidade de cistos no cérebro foi observada em animais não tratados. No intestino o tratamento promoveu aumento significativa na produção de IL-10. Portanto, concluímos que a saliva agiu como um bom imunomodulador, reduzindo vários efeitos colaterais deletérios do processo inflamatório acentuado causado pela infecção por *T. gondii*.

Palavras chaves: Fatores imunológicos, imunidade nas mucosas, proteínas e peptídeos Salivares, doenças inflamatórias intestinais, Doença de Crohn,

## ABSTRACT

C57BL/6 mice when orally infected by *T. gondii* develop a massive inflammatory process that assembly to Crohn Disease. It constitutes a remarkable model to study inflammatory bowel diseases in animal models. At the moment, patients with Crohn disease deal with no accessible and effective treatment. However, the salivary constituents of hematophagous insects have been demonstrated to be a good immunomodulatory component, capable to reduce the exacerbated inflammatory process. At this study, we purpose to analyze the immunomodulatory effects of *R. prolixus* saliva, in an inflammatory bowel disease promoted by *T. gondii*. For this purpose, 3 experimental groups, containing 10 animals, were designed. The treatment was performed intraperitoneally. Control group was treated by 100 $\mu$ L of phosphate-buffered saline (PBS), and other ones were treated with 10 $\mu$ g or 30 $\mu$ g of salivary glandular extract (SGE), diluted in 100 $\mu$ L PBS. The treatment last 23 days and *T. gondii* infection was done by oral gavage on the second treatment day. The clinical scores and the weight were measured daily. The euthanasia was performed on the 23rd day of treatment and brain was collected for further cysts counts and the bowel was also collected for measuring the length. Blood and intestine fragments were collected for cytokines measurement by cytometric bead array. Our results show that SGE acted as a good immunomodulatory factor, bringing down the accentuated inflammatory process caused by *T.gondii* infection. Treatment with SGE in higher concentration decreased clinical scores of *T. gondii* infection. In addition, animals treated with the highest concentration of SGE lost less weight than the other two groups. The treatment provided to the grouped treated with 30 $\mu$ g, greater survive rates and less bowel shrinkage, although without statistical difference between the groups. The group treated with the highest SGE concentration showed significant increase of intestinal secretion of IL-10 in comparison with the group control. The cysts count indicated that no treated animals got more cysts than SGE treated ones. Thus, we conclude that the SGE acted as a good immunomodulatory factor, reducing many complications of the exacerbated immune process caused by *T.gondii* infection.

Keywords: Immunologic factor, immunity mucosal, salivary proteins and peptides, inflammatory bowel diseases, Crohn disease

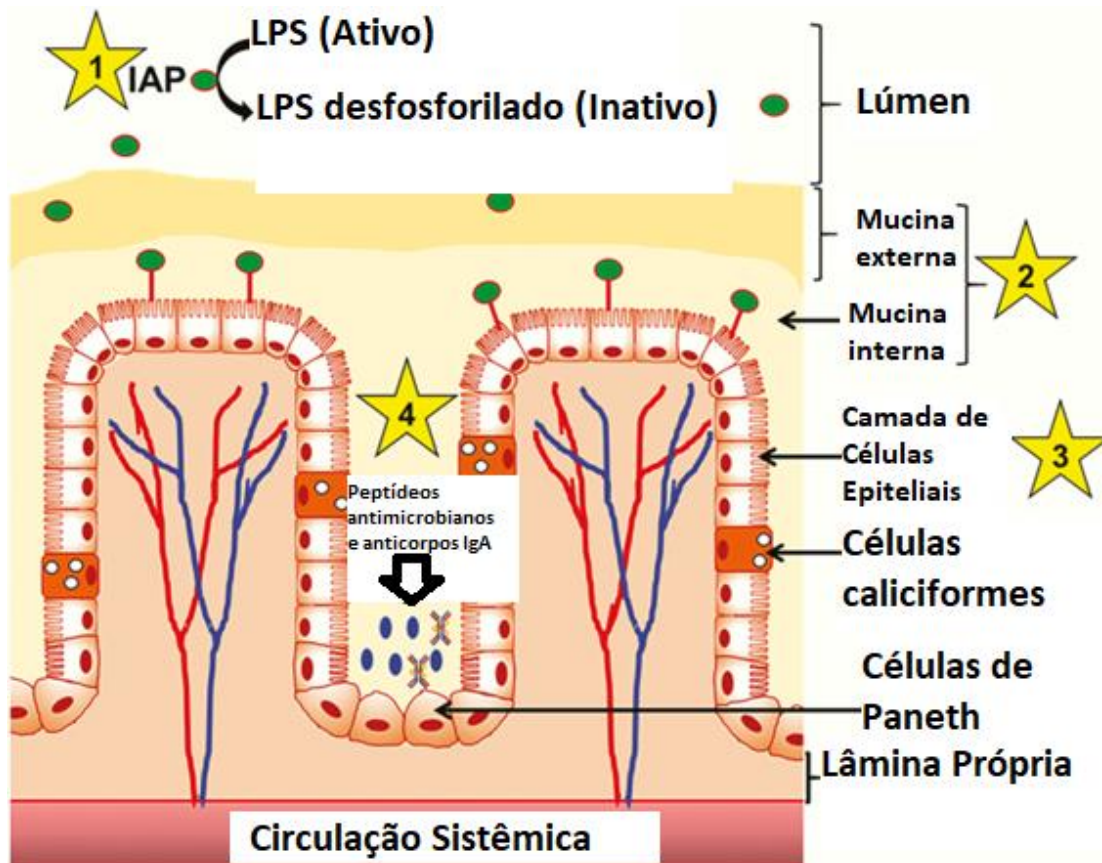
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 BARREIRA INTESTINAL

O epitélio intestinal é constituído por uma única camada de células epiteliais, dando origem à maior barreira protetora e seletiva do nosso corpo. Apesar de figurar-se como a principal entrada de nutrientes advindos do processo de digestão, este órgão nos protege impedindo a entrada de microrganismos e antígenos potencialmente danosos (CHELAKKOT; GHIM; RYU, 2018; VANCAMELBEKE; VERMEIRE, 2017).

Esta barreira localiza-se externamente à região apical do epitélio intestinal e é constituída por 4 camadas, enumeradas à partir do lúmen intestinal (Figura 01). A primeira camada é a fosfatase alcalina intestinal luminal (IAP) que desfosforila os lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias presentes no lúmen, promovendo desintoxicação do meio intestinal. A segunda é definida pela camada de muco que constitui uma barreira física, que previne interações entre patógenos e as células epiteliais intestinais. A terceira é consolidada pelas junções de oclusão entre as células epiteliais, que limitam o transporte paracelular de bactérias e /ou produtos bacterianos até a circulação sistêmica. A quarta é formada pelas proteínas antibacterianas, as quais são secretadas pelas células epiteliais intestinais especializadas, ou pelas células Paneth. Além disso, anticorpos IgA secretados pelos plasmócitos/linfócitos presentes na lâmina própria também contribuem para defesa desta camada (GHOSH et al., 2020).

**Figura 1:** As "camadas" da barreira intestinal. A barreira intestinal funcional consiste em quatro "camadas" (mostradas pelos números 1 a 4). A camada 1, ou fosfatase alcalina intestinal (IAP), desfosforila o LPS luminal ativo, produzindo LPS desfosforilado (inativo). A camada de mucina (camada 2), consiste em uma camada interna firmemente conectada e uma camada externa frouxa, fornece a primeira barreira física que restringe a interação entre bactérias luminiais e células epiteliais. Uma única camada de células epiteliais (camada 3) separa o lúmen da circulação sistêmica. Células secretoras especializadas da camada epitelial, nomeadamente células caliciformes e células de Paneth, contribuem para a formação da camada de mucina e a produção de proteínas antibacterianas, respectivamente. As proteínas / peptídeos antibacterianos derivados de células de Paneth, juntamente com IgA secretada (sIgA), restringem o crescimento bacteriano e representam a quarta camada (camada 4) da barreira intestinal.



Fonte: adaptado de (GHOSH et al., 2020)

A camada de células epiteliais é altamente dinâmica e possui uma marcante taxa de renovação, tendo suas células rapidamente renovadas em poucos dias (OKAMOTO; WATANABE, 2004). Desta forma, estas células possuem o processo de renovação altamente controlado, evitando a perda da homeostase e sobretudo mantendo as funções da barreira (WILLIAMS et al., 2015).

Abaixo das células epiteliais há uma fina camada de tecido conjuntivo, definido como lâmina própria, uma estrutura que nutre uma comunicação saudável entre a microbiota e o sistema imune. O tecido conjuntivo abriga inúmeras células imunes, incluindo linfócitos T,

linfócitos B e macrófagos que atuam no estabelecimento da homeostase intestinal (ERI; CHIEPPA, 2013; SAENZ; TAYLOR; ARTIS, 2008).

As células epiteliais constituem o principal grupo que compõe a barreira intestinal e coletivamente formam uma camada polarizada, contribuindo para estabelecer uma barreira semipermeável e apertada, constituída de junções de oclusão, junções aderentes e desmossomos (CHELAKKOT; GHIM; RYU, 2018). Vários tipos celulares compõem o epitélio intestinal, sendo eles: as células de Paneth, as células caliciformes, os enterócitos e as células M, cada uma com uma função distinta.

As células mais abundantes são os enterócitos que promovem os papéis de absorção de íons, água, nutrientes, vitaminas e sais da bile não conjugados. Estas células são importantes também para manutenção e renovação da barreira (MIRON; CRISTEA, 2012). Foi evidenciado também, que os enterócitos podem participar da indução da tolerância imunológica às proteínas ingeridas. (GROSCWITZ; HOGAN, 2009; KAGNOFF, 2014). As células de Paneth residem na base das criptas intestinais e secretam peptídeos antimicrobianos como  $\alpha$ -defensina, prevenindo a entrada de microrganismos do lúmen intestinal para a corrente sanguínea. As células caliciformes secretam muco, peptídeos da família trefoil e moléculas semelhantes à resistina  $\beta$ , sendo importantes para a defesa e reparo do epitélio, contribuindo para a homeostase (BIRCHENOUGH et al., 2015; SPECIAN; OLIVER, 2017). As células M secretam IgA e ajudam a apresentar antígenos bacterianos para as células dendríticas.

Uma função crucial da barreira epitelial é a manutenção da integridade do órgão, o que permite a passagem essencial de íons, nutrientes e água, mas restringe a passagem de antígenos e microrganismo ofensivos (RESCIGNO, 2011). O transporte através da barreira ocorre por três vias principais: via transcelular (por transporte passivo através dos lipídeos de membranas das células), via paracelular (por transporte passivo entre os espaços celulares) e via mediada por carreamento (transporte carregado por proteínas de membrana).(SUZUKI, 2013).

As junções de oclusão são importantes para o contexto de troca com o meio externo e são constituídas por várias proteínas transmembranas como, ocludinas, claudinas, zônula oclusivas, tricelulina, cingulina e moléculas de adesão juncional (JAM), que interagem entre si e com o citoesqueleto, formando uma estrutura forte e complexa (Figura 02) (GÜNZEL; YU, 2013).



## 1.2 MICROBIOTA INTESTINAL

É estimado que um humano adulto albergue 500-1000 espécies de bactérias em seu corpo (TURNBAUGH et al., 2007), sendo que trilhões de bactérias residem na luz intestinal e possuem papéis importantes nos processos de digestão e no desenvolvimento da imunidade. Apesar disso, a variedade de genótipos presentes pode variar de pessoa para pessoa, apresentando diferentes níveis de diversidade e riqueza de espécies em cada indivíduo (LOCEY; LENNON, 2016).

Estes microrganismos são importantes no metabolismo do hospedeiro e figuram atualmente como importantes fontes de novas terapias. Com o desenvolvimento de técnicas de metagenômicas e de análises dos genes da subunidade 16S do RNA ribossomal (16 rRNA), foi permitida uma análise mais aprimorada da microbiota intestinal, enaltecendo suas características e funções. Esta complexa comunidade de organismo é composta por vários *taxa*, incluindo fungos, protistas e vírus (CANI, 2018).

Recentemente, foi descrito que as bactérias da microbiota intestinal podem comunicar-se com as células dos hospedeiros e promover interações imunes. A partir disso, vários estudos conseguiram correlacionar a presença de algumas doenças com um desbalanço na microbiota intestinal, incluindo doenças inflamatórias intestinais, distúrbios cardiometabólicos, transtornos neuropsiquiátricos e câncer (CLEMENTE et al., 2012; LOUIS; HOLD; FLINT, 2014).

Diferentes sistemas reconhecem e monitoram a presença de microrganismos no corpo. No trato gastrointestinal, esta função é delegada às células epiteliais que são responsáveis por informar as células imunes que estão abaixo, na lamina própria. O reconhecimento dos microrganismos é promovido por receptores de reconhecimento padrão (PRR), receptores do tipo toll (TLR) e receptores do tipo NOD (NLR). Juntos estes receptores reconhecem padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), incluindo lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, flagelina, dentre outros (O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013).

Sabe-se que os sistemas imunes inato e adaptativo precisam entrar em contato com a microbiota para se desenvolverem com eficiência. Camundongos livres de germes possuem reduzida a quantidade de imunoglobulina A (IgA) secretada, além de possuírem defeitos no desenvolvimento de tecidos linfóides e nas placas de Peyer. A IgA promove importante papel

na imunidade da barreira intestinal, sendo induzida em resposta à colonização por bactérias comensais específicas, protegendo as superfícies mucosas e contribuindo para o mutualismo da microbiota hospedeira (BOUSKRA et al., 2008; MACPHERSON; GEUKING; MCCOY, 2011; PETERSON et al., 2007).

A microbiota possui um papel importante na imunidade, foi observado que, as populações de células T não são somente selecionadas pelo sistema reconhecimento de antígenos próprios, mas também, por interferência do microbioma e seus antígenos. Bactérias intestinais também são capazes de promover mudanças na resposta imune intestinal protegendo-as de uma resposta imune danosa, que culminariam no desenvolvimento de doenças (KUHN; STAPPENBECK, 2013; LEE; MAZMANIAN, 2010).

### 1.3 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são enfermidades idiopáticas classificadas em dois tipos de distúrbios intestinais crônicos: a Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU). Estudos epidemiológicos evidenciam maior prevalência destas doenças em países desenvolvidos e desde o século passado a incidência vem aumentando drasticamente (KAPLAN, 2015; MOLODECKY et al., 2012).

As evidências acumuladas nos últimos trabalhos sugerem que o surgimento da doença é causada em hospedeiros geneticamente suscetíveis e desencadeada por uma resposta imune inadequada e exacerbada contra a microbiota intestinal (SARTOR, 2006). A doença é caracterizada também por períodos de atividade e remissão podendo apresentar diferenças na gravidade clínica (BASSO et al., 2014).

A DC é caracterizada por intensa inflamação granulomatosa transmural e pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, mas comumente íleo, cólon ou ambos (THIA et al., 2010). Já a RCU é definida por inflamação não infecciosa descontrolada da mucosa colorretal, atingindo desde o início do reto até os segmentos proximais do cólon (GHOSH, 2000).

A etiologia das DII não está bem elucidada, no entanto estudos apontam que uma série de fatores imunológicos, genéticos e ambientais são cruciais para o desencadeamento da doença. A principal hipótese que explica a patogênese das doenças inflamatórias intestinais é construída no fato que há uma resposta imune desregulada contra os antígenos da microbiota intestinal (KO; AUYEUNG, 2014; SARTOR, 2008).



Embora a patogênese da DII ainda seja complexa de ser elucidada, vários estudos demonstraram que a produção da interleucina IL-17 está envolvida na progressão das DII. Recentemente, a pesquisa sobre a patogênese da DII se concentrou em T células auxiliares Th17, que secretam IL-17. Está bem documentado que a inibição de Th17 pode diminuir o desenvolvimento de colite aguda pela redução do processo inflamatório. Além disso, células linfoides inatas (ILCs) foram descobertas como novos linfócitos efetores patogênicos em DII (LEE et al., 2015).

### 1.3.1 Doença de Crohn

Até metade do século XX a incidência de DC era muito baixa, sendo que após a segunda guerra mundial países industrializados experimentaram aumento exponencial no número de casos, apesar de os números de casos serem reduzidos em nações mais pobres. Cerca de 15% dos portadores de DC reportaram ter outros casos na família, enaltecendo o fundo genético que pode ser um dos fatores para o desencadeamento da doença (GAJENDRAN et al., 2018).

O fumo é um fator de risco para DC, incluindo fumantes passivos. Os fatores atrás dessa causa apontam que a nicotina tem a capacidade de alterar a integridade da mucosa e influenciar mudanças na microbiota intestinal (BIEDERMANN et al., 2014; MCGILLIGAN et al., 2007).

A dieta se consolida como um forte fator de risco para o desenvolvimento de DC. Estudos observacionais apresentaram que quanto maior a ingestão de fibras menor é o risco de desenvolvimento da doença. A redução do risco é promovida por meio da ingestão de fibras de frutos e não foi observado vantagens benéficas por meio da digestão de cereais e legumes. O mecanismo que sustenta esta hipótese está na capacidade das bactérias da microbiota de transformar as fibras em pequenas cadeias de ácido graxos que inibem a transcrição mediadores pró-inflamatórios (ANANTHAKRISHNAN et al., 2013<sup>a</sup>; GALVEZ; RODRÍGUEZ-CABEZAS; ZARZUELO, 2005).

Fibras também ajudam a manter a integridade da barreira epitelial e reduzir a translocação de *E. coli* através das placas de Peyer, conforme demonstrado em estudo *in vitro* utilizando monocamadas de células M, geradas pela co-cultura de células Caco2-c11 e Raji B e placas de Peyer humanas montadas nas Câmaras de *Ussing* (ROBERTS et al., 2010).

Estudos com animais mostraram que uma dieta com gorduras saturadas está associada com intensa resposta inflamatória mediada por linfócitos em camundongos nocautes para IL-10 (DEVKOTA et al., 2012). No entanto, estudos prospectivos não conseguiram confirmar esse fator em humanos (CHAPMAN-KIDDELL et al., 2010).

O estilo de vida pode impactar fortemente no desenvolvimento da DC. Estresse, distúrbios de sono e a falta de exercícios são os principais fatores que impactam os pacientes. Distúrbios de sono foram mais relatados em pacientes com a forma ativa de DC (ANANTHAKRISHNAN et al., 2013b). Estudos de coorte também mostraram que ansiedade, depressão e estresse estão relacionados com o desenvolvimento de DC (ANANTHAKRISHNAN et al., 2013c). O exercício físico está relacionado com redução da incidência de DC, desta forma entende-se que as ocupações de trabalho mais sedentárias estão relacionadas com maior incidência de casos de doença de Crohn (SONNENBERG, 1990).

A apendicectomia está relacionada também com a incidência de DC. Em um grande estudo de coorte, pacientes submetidos à apendicectomia por apendicite aguda e linfadenite mesentérica tiveram maior incidência de DC. Para a incidência da doença, o motivo da apendicectomia parece ser um fator importante na determinação do desfecho. A apendicectomia realizada para apendicite perforante está associada a maior risco de desenvolvimento de DC, enquanto a apendicectomia por outras causas está associada a um menor risco de DC (ANDERSSON et al., 2003).

Pacientes com DII possuem reduzida diversidade da microbiota intestinal quando comparados a indivíduos saudáveis, mudança que é mais pronunciada em indivíduos com DC que em RUC. Fatores que alteram a microbiota intestinal são diversos, desde a exposição prematura a animais, amamentação, estresse e dieta (MATSUOKA; KANAI, 2015).

Estudos mostram que pacientes com DII possuem altas quantidades de *E. coli* invasivas. Estas bactérias possuem a capacidade de invadir o epitélio intestinal, e se replicar nos macrófagos. Apesar disso, algumas bactérias da microbiota promovem proteção contra as doenças inflamatórias intestinais (PALMELA et al., 2018).

Ainda não há cura para a doença de Crohn, os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da doença focam em reduzir o processo inflamatório exacerbado, permitindo minimizar os sintomas, a progressão e complicações da doença. As drogas mais utilizadas são: aminossalicilatos, corticosteroides, imunomoduladores e biológicos. O tratamento *Top-down* é iniciado com medicamento mais potentes como imunomoduladores e ao longo do tratamento é reduzido a potência dos medicamentos proporcionalmente à melhora. Já o tratamento *step-up* é iniciado com medicamentos menos potentes e com menos

efeitos colaterais, intensificando o tratamento de acordo com o aumento da gravidade ou a ausência de remissão da inflamação. A escolha do tipo de drogas e estratégia de tratamento leva inúmeros fatores pessoais como, efetividade do tratamento, gravidade, idade, morbidades, gravidez, dentre outros. Além disso, a toxicidade e os efeitos colaterais dos medicamentos usados no tratamento devem ser considerados. Nos países de terceiro mundo, o alto custo do tratamento pode impactar os sistemas de saúde ou dificultar o acesso às drogas(SAIRENJI; COLLINS; EVANS, 2017).

O desencadeamento da patologia da doença de Crohn ainda não foi esclarecida por completo. Apesar disso, já se sabe que a liberação de citocinas como IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17 e TNF- $\alpha$  são responsáveis pela inflamação. Além disso, as bactérias que translocam a barreira intestinal alimentam esta resposta imune exacerbada e contribuem para a patologia da doença(DE MATTOS et al., 2015).

Embora a etiologia das DIIs não esteja totalmente elucidada, diversos estudos mostram que alguns parasitos com fases de infecção intestinais podem estar relacionados a alteração da resposta imunológica e à instabilidade da microbiota intestinal. Conseqüentemente, infecções parasitárias, tais como infecção por *Toxoplasma gondii*, podem ter relação com o desenvolvimento das doenças intestinais (MOHAMMADI et al., 2015). Compreender a correlação entre infecções parasitárias e distúrbios autoimunes pode ser útil na previsão, identificação precoce e, possivelmente, na prevenção dessas doenças (MOHAMMADI et al., 2015).

#### 1.4 *Toxoplasma gondii* E TOXOPLASMOSE

A toxoplasmose é uma das zoonoses mais prevalentes no mundo, atingindo cerca de 1/3 da população mundial (SAADATNIA; GOLKAR, 2012). A transmissão é desencadeada principalmente por meio do consumo de carne crua ou malcozida contendo cistos e/ou pela ingestão de alimentos contaminados com oocistos. Pode ocorrer também a transmissão congênita, na qual a mãe, que não possui anticorpos protetores se infecta e transmite via transplacentária para o feto, podendo levar a malformações e ao aborto (JONES et al., 2001).

*T. gondii* é capaz de infectar e se replicar em praticamente qualquer célula nucleada de animais endotérmicos. Seu ciclo de vida é dividido entre uma fase sexuada (Felídeos) e uma

fase assexuada (todos animais endotérmicos) (KOCHANOWSKY; KOSHY, 2018).

Quando os felídeos ingerem os cistos contendo os bradizoítos ou esporozoítos maduros, que são as formas infectantes, ocorre a penetração nas células epiteliais do intestino delgado pelos bradizoítos provenientes dos cistos ou pelos esporozoítos provenientes do oocisto. Os bradizoítos multiplicam-se assexuadamente por um processo denominado merogonia, originando merozoítos que por sua vez, darão origem aos gametas masculinos e femininos. O gameta feminino é então fecundado pelo masculino e após a fertilização, forma-se a parede do oocisto em volta do zigoto, ocorrendo então, a liberação dos mesmos no lúmen intestinal por meio da ruptura das células epiteliais intestinais e eliminação nas fezes dos felídeos. Os oocistos esporulados em condições ideais de temperatura e umidade no ambiente contêm oito esporozoítos (HUTCHISON et al., 1969).

A fase assexuada consiste em dois estágios distintos de crescimento, dependendo se a infecção está na fase aguda ou crônica. O estágio de taquizoítos define a forma de crescimento rápido do parasita que é encontrado durante a fase aguda da toxoplasmose. Os taquizoítos têm aproximadamente 5µm de comprimento e 2µm de largura (DUBEY, 1998). Eles se replicam dentro de uma célula com um tempo de geração de novos parasitas de 6-8 h (*in vitro*) até que eles saiam da célula para infectar as células vizinhas, geralmente após 64 a 128 parasitas terem se acumulado por célula (RADKE; WHITE, 1998).

No animal infectado, os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos e formam cistos teciduais que aparecem pela primeira vez 7 a 10 dias após a infecção. Esses cistos são encontrados predominantemente no sistema nervoso central e tecido muscular, onde podem permanecer durante a vida do hospedeiro (BOGITSH; CARTER; OELTMANN, 2013).

O desenvolvimento de cistos teciduais por todo o corpo define o estágio crônico do ciclo de vida do parasita. Quando a infecção é mediada por cistos por meio da ingestão de tecido infectado, estes são rompidos à medida que passam pelo trato digestivo, causando liberação de bradizoítos. Estes bradizoítos podem então infectar o epitélio do lúmen intestinal, onde se diferenciam de volta ao estágio de taquizoítos de divisão rápida para disseminação por todo o corpo, completando assim a fase assexual do ciclo de vida (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005; KOCHANOWSKY; KOSHY, 2018; MCCONNAUGHEY, 2014).

A infecção oral por *T. gondii* induz necrose no intestino delgado e morte de hospedeiros suscetíveis. Em muitos aspectos a patologia intestinal causada por *T. gondii* assemelha-se às DII. Citocinas consideradas importantes no combate à infecções por *T.*

*gondii*, tais como o fator de inibição de migração de macrófagos (MIF), podem contribuir para o agravamento da inflamação intestinal em infecções orais por *T. gondii* (TERRAZAS et al., 2010, CAVALCANTI et al., 2011).

### 1.5 INFECÇÃO POR *T. gondii* COMO MODELO PARA AS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

Os modelos murinos para ileíte são escassos, no entanto camundongos C57BL/6 após a infecção oral por *T. gondii*, desenvolvem um processo inflamatório exacerbado no íleo com resposta Th1, com produção de IFN- $\gamma$  semelhante a pacientes com doença de Crohn ativa. A inflamação durante a infecção é dependente da IL-23, condição que foi confirmada anteriormente como um fator de risco na DC em estudos utilizando animais *knockout*. O desenvolvimento da condição clínica favorece o surgimento de *E. coli* que exibem adesão aumentada ao epitélio intestinal e translocação subepitelial (ADEN et al., 2016; EGAN et al. 2009).

O início da resposta imune a *T. gondii* é desencadeado pela imunidade inata na mucosa do intestino delgado. Neste local, os parasitos precisam enfrentar uma barreira imunológica caracterizada especialmente pela presença da IgA e muco. O hospedeiro possui uma camada de células epiteliais que separam a luz intestinal dos demais órgãos e tecidos. Além dessa função, as células epiteliais são fonte de citocinas e coordenam o recrutamento de células de defesa. As células de Paneth atuam na produção de defensinas e outros peptídeos antimicrobianos (COHEN; DENKERS, 2015; SHAO; SERRANO; MAYER, 2001).

No epitélio intestinal existe uma população de células denominadas linfócitos T intraepiteliais (IEL), cuja origem e função são pouco compreendidas. Essas células podem expressar o receptor da célula T  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$  (TCR). Alguns expressam um homodímero CD8 $\alpha\alpha$  ou um heterodímero CD8 $\alpha\beta$  convencional, enquanto outros podem expressar CD4 e CD8 juntos, e outros ainda podem não expressar nenhum deles. A população de IEL tem sido implicada na homeostase tecidual, mas também pode contribuir para o surgimento de patologia pró-inflamatória durante a doença (CHEROUTRE; LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011; KUNISAWA; TAKAHASHI; KIYONO, 2007).

Os enterócitos são as primeiras células que o parasita infectará e que, como forma de defesa, produzirão citocinas IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Para vencer a barreira física e imunológica os parasitos desenvolveram várias estratégias de aderência, evasão do sistema imune, invasão

dos enterócitos e disseminação além do epitélio (BARRAGAN; SIBLEY, 2003; BOUT et al., 1999).

Abaixo do epitélio há a lâmina própria que abriga inúmeros perfis celulares, muitas dessas são essenciais para a tolerância imunogênica. Nesse compartimento podemos encontrar células TCD4+ e CD8+, linfócitos B que produzem anticorpos IgA e mais recentemente foram encontradas células inatas linfoides. Três populações são atualmente reconhecidas (ILC1, ILC2 e ILC3) que são responsáveis em parte na produção de citocinas incluindo IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 e IL-22 (BEKIARIS; PERSSON; AGACE, 2014; SANOS; DIEFENBACH, 2013).

Na mucosa intestinal é possível encontrar tecidos linfoides chamados Placas de Peyer que contêm linfócitos B e T e células dendríticas. As células M, são células epiteliais especializadas que coletam o conteúdo da luz intestinal através da transcistose. Após este procedimento os antígenos são levados para as células imunitárias que estão abaixo. A mucosa intestinal é drenada por vasos linfáticos, por esta via os linfonodos mesentéricos também podem adquirir antígenos (COHEN; DENKERS, 2015; CORR; GAHAN; HILL, 2008).

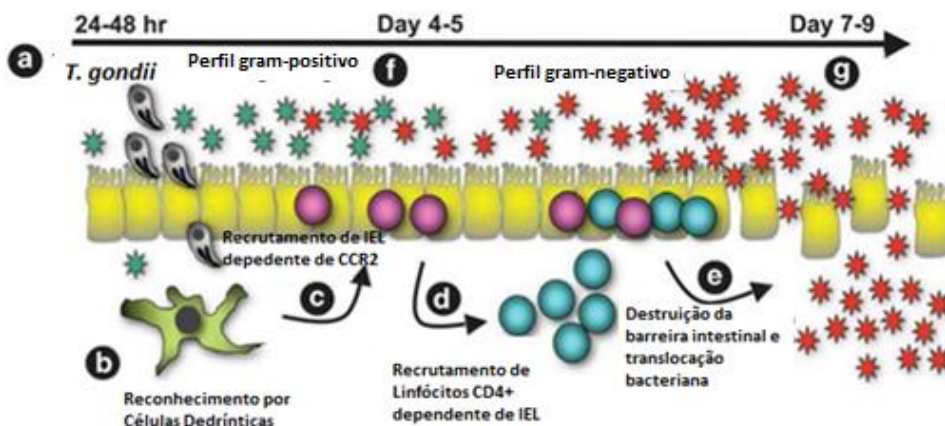
Após 24 à 48h de infecção os parasitas atravessam a barreira intestinal, utilizando o sistema de proteínas apical. Inicia-se a infecção em células dendríticas e macrófagos e ocorre o reconhecimento dos parasitas pelas células dendríticas e o recrutamento de linfócitos intraepiteliais por meio do receptor de quimiocina C-C tipo 2 (CCR2). Os linfócitos intraepiteliais recrutam da lâmina própria as células TCD4+ (Figura 3) (BENEVIDES et al., 2008; EGAN et al., 2009).

Durante a infecção por *T. gondii* em camundongos C57BL/6 ocorre massiva necrose da mucosa intestinal no íleo. Estas lesões necrosadas assemelham-se patologicamente às doenças inflamatórias intestinais em humanos. O processo de necrose é dependente de linfócitos CD4+, IFN- $\gamma$  e óxido nítrico. Este intenso processo inflamatório leva a destruição da barreira, permitindo a translocação bacteriana (KHAN et al., 1997; LIESENFELD et al., 1996).

Em quadros de DC os pacientes podem ser tratados com corticoides, imunossupressores e imunobiológicos. Apesar destas opções de tratamento, alguns pacientes ainda sofrem, pois para alguns portadores da doença o tratamento não se mostra efetivo, os medicamentos são de alto custo e a presença de efeitos colaterais é recorrente (BAUMGART; SANDBORN, 2012). Desta forma, é importante realizar a busca de novas opções de tratamento para a DC, visando trazer drogas de maior efetividade e acessibilidade aos

pacientes. Diversos estudos retratam a habilidade imunomoduladora da saliva de artrópodes, constituindo uma importante fonte de imunobiológicos (LEITNER; DENIS; WALI, 2011).

**Figura 3:** Exemplificação da patologia intestinal durante infecção oral por *T. gondii*. (a) Entre 24 e 48 horas após a ingestão do cisto, os parasitas atravessam o epitélio do intestino delgado, iniciando a infecção em macrófagos e células dendríticas. (b) As células dendríticas reconhecem e iniciam a imunidade a *T. gondii*. Ao mesmo tempo, há resposta imunológica às bactérias intestinais, possivelmente como resultado da translocação, que ocorre quando os parasitas atravessam e degradam a barreira intestinal. (c) A inflamação no início, resulta no recrutamento de células T CD8+ para o compartimento linfocitário intraepitelial, detectável 4-5 dias após a infecção. (d) Por sua vez, o IEL (Linfócito Intraepitelial), está envolvido no recrutamento de células T CD4+ da lâmina própria para o compartimento intraepitelial. (e) Todo este processo, resulta em danos ao intestino e à translocação bacteriana. Culminando, com a imunopatologia inflamatória do tipo Th1, que atinge seu pico em torno de 7 a 9 dias após a infecção. Concomitantemente ao surgimento da doença, a microbiota intestinal aumenta em número e muda de uma população predominantemente gram-positiva (f) para uma população gram-negativa com características de adesão aumentadas (g).



Fonte: adaptado de:(EGAN; COHEN; DENKERS, 2012)

## 1.6 SALIVA DE TRIATOMÍNEO COMO FORMA DE TRATAMENTO

Os triatomíneos são insetos pertencentes a ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Este táxon possui grande importância na ecologia, pois são um dos poucos insetos da subordem Heteroptera que se alimentam de sangue de animais. Além disso, estes invertebrados possuem importância na saúde pública, pois alguns triatomíneos são transmissores de *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de chagas (SCHAEFER; PANIZZI, 2000).

O tamanho relativo dos insetos adultos varia de 12 a 36mm e possuem 5 estádios imaturos, morfologicamente similar aos adultos, exceto a ausência de asas. Ambos sexos se

alimentam de sangue de vertebrados em todas as fases da vida, começando com a primeira refeição 2 a 3 dias após a eclosão dos ovos. O inseto é capaz de transmitir o parasita em todas as suas fases de vida, no entanto nos primeiros repastos sanguíneos o triatomíneo comumente se infecta com *T. cruzi* (STEVENS et al., 2011).

Para que estes insetos hematófagos possam se alimentar com sucesso eles necessitam modular a resposta imune, a inflamação e hemostasia do hospedeiro. Devido a isso, durante o processo evolutivo a saliva destas espécies passou a ser dotada de inúmeras moléculas com propriedades farmacológicas, permitindo o aprimoramento do repasto sanguíneo (WIKEL, 1999). A saliva destes insetos não possui somente atividades anti-hemostáticas. É notável que a resposta imune do hospedeiro pode alterar as atividades de hematofagia do inseto e conseqüentemente provocar danos ao seu ciclo de vida. Devido a isso é esperado que os triatomíneos possuam também na sua saliva propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras (SUTHERLAND; EWEN, 1974).

A saliva do triatomíneo tem se mostrado eficiente na modulação da resposta imune e alguns estudos já comprovam sua eficácia no tratamento de doenças inflamatórias intestinais, reduzindo o quadro de inflamação exacerbado e sobretudo diminuindo os danos causado pelo processo imunopatológico (SALES-CAMPOS et al., 2018<sup>a</sup>).

A infecção por *T. gondii* causa robusta resposta imune mediada por células, possuindo o IFN- $\gamma$  como uma importante citocina no controle da infecção (SHER et al., 1993). No modelo murino de doenças inflamatórias intestinais, receptores do Tipo Toll exercem um papel essencial, permitindo o reconhecimento e início da resposta inflamatória. A ausência de receptores do tipo Toll, como TLR 11 e possivelmente TLR2, resulta na diminuição da secreção de IFN- $\gamma$  (BENSON et al., 2009; YAROVINSKY, 2008). Apesar disso, as bactérias comensais do intestino têm papel importante na intensidade de resposta imune que será promovida contra o parasita, cenário que é bastante semelhante nas doenças inflamatórias intestinais (HEIMESAAT et al., 2006).

Durante o tratamento das doenças inflamatórias intestinais, o objetivo principal é a redução do processo inflamatório. Para isso, na maiorias das vezes utilizam-se imunobiológicos que possuem alto custo para o paciente e para os sistemas de saúde. Para alguns grupos de pacientes, o tratamento da doença possui importantes efeitos colaterais e resultados insatisfatórios (BAUMGART; SANDBORN, 2007). Desta forma, é importante analisar novas modalidades de tratamento, visto que as atuais apresentam diversos problemas de custo, efetividade e bastantes efeitos colaterais.



## 2 JUSTIFICATIVA

O intestino apresenta-se como um microambiente constantemente desafiado a manter tolerância imunológica a bactérias comensais e antígenos alimentares. Por outro lado, quando o organismo se depara com agentes infecciosos, tais como *T. gondii*, o combate à infecção requer secreção de mediadores inflamatórios, associada à ativação da imunidade inata e adaptativa. A resposta à infecção envolve quebra de tolerância e desenvolvimento de resposta Th1 que podem alterar a microbiota e a estrutura íntegra da barreira intestinal.

Em alguns modelos de estudo, tais como camundongos C57BL/6, a infecção por *T. gondii* é capaz de induzir uma inflamação intestinal cujas características são compartilhadas com a patogênese das doenças inflamatórias intestinais, em particular a doença de Crohn.

A saliva de triatomíneos apresenta um arsenal de moléculas capazes de suprimir a resposta imunológica de vertebrados. Estudos mostram que esta saliva apresenta potencial terapêutico capaz de suprimir a inflamação em doenças mediadas pelo sistema imunológico. Neste contexto, a infecção por *T. gondii* em camundongos C57BL/6 pode trazer novas descobertas sobre as doenças inflamatórias. Muitas questões sobre os determinantes da imunidade funcional versus disfuncional permanecem inexplicáveis, particularmente no contexto do sistema imune da mucosa.

Assim, são importantes os estudos capazes de fornecer informações de como a terapia, baseada no uso de saliva de triatomíneos como fonte de moléculas imunomoduladoras, pode alterar o resultado da resposta imunopatológica desencadeada pela infecção por *T. gondii*. Além disso, avaliar a consequência desta imunomodulação no índice de infecção por *T. gondii* pode contribuir para uma melhor compreensão da interação parasito hospedeiro no microambiente intestinal. Por fim, estudar os efeitos da administração da saliva de *R. prolixus*, em um modelo de estudo que compartilha características semelhante com a ileíte da doença de Crohn, traz novas informações sobre o entendimento da doença, que afeta milhares de pessoas em todo o mundo e é capaz de causar danos irreversíveis à função e estrutura do sistema gastrointestinal.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar os efeitos imunomodulatórios da saliva *R. prolixus* na infecção intestinal por *T. gondii*

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar o escore de morbidade de animais infectados com *T. gondii* e tratados ou não com saliva de triatomíneos;
- Mensurar variação de pesos de animais infectados com *T. gondii* e tratados ou não com saliva de triatomíneos;
- Avaliar alterações de comprimento do intestino delgado dos animais nos diferentes grupos experimentais;
- Quantificar cistos em macerados de cérebro;
- Avaliar os índices de sobrevivência nos diferentes grupos experimentais.
- Avaliar e comparar os níveis de citocinas séricas e intestinais produzidos em cada grupo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Foram utilizados 10 camundongos machos C57BL/6 para cada condição experimental, sendo 30 animais no total, com 8 à 10 semanas de idade. Além disso, foram utilizados roedores da espécie *Calomys callosus* que forneceu cistos para infectar os animais experimentais. Estes animais foram mantidos na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da UFU (Universidade Federal de Uberlândia). Todos os animais tiveram acesso *ad libitum* à ração e água filtrada, como também foram mantidos em ciclos 12 horas escuro/luz e temperatura controlada. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFU sob protocolo nº 023/19 (Anexo I).

### 4.2 COLETA, ARMAZENAMENTO E DETERMINAÇÃO PROTEICA DO EXTRATO DE GLÂNDULA SALIVAR (EGS) DE *R. prolixus*

Os triatomíneos para extração das glândulas salivares foram obtidos da colônia do Insetário da UFTM (Universidade Federal do Triângulo Mineiro). Para realização do projeto foram solicitados 210 insetos da espécie *R. prolixus*. Para a dissecação das glândulas salivares, os triatomíneos foram limpos em água destilada e etanol 70%. Depois, foi separado o segmento cabeça do segmento tórax e feita a dissecação das glândulas do tubo digestório. Em fluxo laminar, foi feita a perfuração das glândulas salivares utilizando agulhas e posteriormente, realizada centrifugação a 11.000 x g por 15 min à 6°C. Então, coletou-se o sobrenadante contendo o EGS. Após a coleta, o extrato foi mantido a -80 °C até o momento do uso. A dosagem da concentração proteica do EGS foi feita usando Nanodrop 2000 (ThermoFisher, EUA) e para atingir a concentração 10 ou 30µg/100µL de solução foi feita a diluição em PBS estéril.

#### 4.3 OBTENÇÃO DOS CISTOS DE *T. gondii*

A cepa ME-49 de *T. gondii* foi mantida em encéfalos de *C. callosus* machos de acordo com BARBOSA e colaboradores (2007). Para isso, *C. callosus* machos previamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* foram anestesiados com solução de xilazina (10mg/kg) (Syntec, Hortolândia, SP, Brasil) e cetamina (100mg/kg) (Syntec) e eutanasiados por deslocamento cervical. Os encéfalos dos animais foram removidos assepticamente, lavados, macerados e homogeneizados em 2 mL de PBS estéril (pH 7.2) por aspiração usando seringa de 5mL e agulha de 25x7mm. Alíquotas de 20µL da solução obtida foram observadas em microscópio de luz (objetiva 10x) para contagem de cistos teciduais. Após contagem dos cistos, estes foram ressuspensos em tampão PBS estéril para obter uma concentração final de 20 cistos por de 100µL de PBS. Esta suspensão foi utilizada para infecção dos animais C57BL/6 (20 cistos em 100µL de PBS) por gavagem utilizando cânula rígida com extremidade arredondada, com a qual a solução foi administrada pela boca, diretamente no estômago do animal.

#### 4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em 03 grupos experimentais:

- Camundongos infectados e não tratados (injeção diária de salina)
- Camundongos infectados e tratados com saliva de *R. prolixus* (10µg)
- Camundongos infectados e tratados com saliva de *R. prolixus* (30µg)

Os animais foram tratados intraperitonealmente (IP) com saliva de *R. prolixus* (10 ou 30µg em 100µl de PBS). O grupo controle recebeu salina nas mesmas condições do grupo tratado. Dois dias após início do tratamento, os animais foram infectados via oral, por gavagem com 20 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* em 100µl de PBS, obtidos de macerados de cérebros de *C. callosus* previamente infectados, conforme descrito acima.

Após infecção os animais foram tratados com solução de saliva por inoculação intraperitoneal (IP) com 100µl de solução de saliva de *R. prolixus* contendo 10 ou 30µg de proteínas da saliva, por mais 21 dias consecutivos após infecção, totalizando 23 dias de

tratamento e 21 dias de infecção (fase crônica da infecção). O grupo controle foi tratado com injeção de PBS pelo mesmo período.

Os animais foram avaliados diariamente, aproximadamente no mesmo horário (durante 23 dias), quanto a variações no score de morbidade, conforme descrito por BARTLEY et al. (2006), com modificações. Para isso foram avaliados os seguintes parâmetros: fezes (normal, curtas e ausentes), atividade (ativo, hipoativo, hipoativo prostrado), pelagem (brilhante, pouco arrepiada, arrepiada e muito arrepiada), postura (normal, pouco arqueado, arqueado e muito arqueado), hidratação (normal, pouco desidratado, desidratado e muito desidratado) (TABELA 1). Por meio da soma total dos valores obtidos em cada parâmetro foi obtido o escore diário atribuído para cada animal. Além disso, aferiu-se o peso corporal dos animais e a variação de peso foi calculada pela diferença entre a medida de peso obtida diariamente pelo peso inicial de cada camundongo (anterior ao tratamento).

Avaliou-se ainda o índice de sobrevivência dos animais durante o mesmo período. Após o período de 23 dias de tratamento e 21 dias de infecção, os animais sobreviventes foram eutanasiados. A seguir, coletou-se o intestino dos animais para avaliação da medida total do intestino delgado de cada animal. Coletou-se ainda o cérebro dos animais para avaliação de parasitismo tecidual.

**Tabela 1** – Parâmetros de escores avaliados e valores atribuídos em cada situação.

<b>Fezes</b>	<b>Atividade</b>	<b>Pelagem</b>	<b>Postura</b>	<b>Hidratação</b>
Normal	Ativo	Brilhante	Normal	Normal
0 pontos	0 pontos	0 pontos	0 pontos	0 pontos
Curtas	Hipoativo	Pouco arrepiada	Pouco Arqueado	Pouco Desidratado
2 pontos	1 ponto	1 ponto	1 ponto	1 ponto
Ausente	Hipoativo	Arrepiada	Arqueado	Desidratado
		2 pontos	2 pontos	2 pontos
4 pontos	Prostrado	Muito arrepiada	Muito arqueado	Muito desidratado
	2 pontos	4 pontos	4 pontos	4 pontos

Fonte: Arquivo do autor

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO PARASITÁRIA EM MACERADO DE CÉREBRO

Após a eutanásia, o cérebro de cada animal foi coletado e um fragmento correspondente a ¼ do órgão foi utilizado para contagem de cistos. O fragmento foi pesado, homogeneizado em formaldeído 10% tamponado com PBS. O volume da solução foi ajustado ao peso do fragmento de modo a se obter uma concentração de 1mg/µL. A homogeneização foi realizada por aspiração usando seringa de 1mL e agulha de 25x7mm. Após este procedimento, foram pipetados 20µL de amostra em lâmina de microscopia. Foi colocada lamínula sobre a amostra a qual foi analisada em microscópio de luz, com objetiva de 10x. Foram contados todos os cistos em todos os campos microscópicos. Após isso, foi feito um cálculo de estimativa de cistos em 1mL de amostra.

#### 4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO (*CYTOMETRIC BEAD ARRAY* – CBA)

As citocinas nos soros e no intestino dos camundongos foram quantificadas por citometria de fluxo, conforme as instruções do kit *Cytometric Bead Array*<sup>TM</sup> (BD BIOSCIENSE, SAN JOSE, CA). Foi feita a detecção de citocinas murinas de perfil Th1/Th2/Th17, sendo elas: IFN-γ, TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17.

Os soros dos animais foram adicionados a tubos indicados para citometria de fluxo, denominados tubos FACS. Para a detecção no intestino, fragmentos de intestino previamente congelados foram macerados em tampão de radioimunoensaio (RIPA) e adicionados em coquetel de inibidor de protease. A seguir, o homogenato foi centrifugado a 15000g durante 30min a 4°C, o sobrenadante foi coletado, diluído 5x com o diluente do kit e colocado nos tubos para citometria.

Após, acrescentou-se aos tubos de amostras uma mistura de *beads* de captura de citocinas e os anticorpos de detecção conjugados com fluorocromo. Os tubos foram incubados por 3 horas à temperatura ambiente e na ausência de luz. A seguir, as amostras foram centrifugadas (400xg durante 10 minutos) e os sobrenadantes foram descartados.

A seguir, as *beads* foram ressuspensas em tampão e as amostras foram submetidas

ao citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Company) do laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Os dados foram analisados utilizando o *software* BD FACSDiva™. As concentrações de citocinas foram obtidas em referência à uma curva padrão, construída através de concentrações já conhecidas e determinadas. A concentração de citocinas foi expressa em pg/mL.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram conduzidos com um  $n$  amostral que variou entre 7 e 10 animais/grupo (alterando o  $n$  amostral de acordo com o índice de mortalidade em cada grupo). As diferenças entre as condições experimentais foram analisadas pelo programa *Graph Pad Prisma*. Dados paramétricos foram analisados pelo teste *One-way ANOVA*, com pós-teste de Sidak para comparações múltiplas. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis (para comparações simples ou múltiplas, respectivamente). Dados de sobrevivência foram apresentados como teste de Kaplan-Meier e analisados com teste de log-rank. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 VARIAÇÃO MÉDIA DIÁRIA DE ESCORES CLÍNICOS DE MORBIDADE

No decorrer dos 23 dias, os animais infectados e tratados foram acompanhados e foi atribuído uma soma diária de escore clínico para cada animal. Dessa forma, foi possível saber se o tratamento com extrato de glândula salivar, modificaria os escores clínicos promovidos pela infecção oral por *T. gondii*.

O tratamento foi iniciado no dia 1 e a infecção no dia 3. Até o oitavo dia de tratamento, os animais não apresentam valores de escores maiores que 0 (FIGURA 4). No nono dia de tratamento, os animais começaram a apresentar os sintomas da infecção oral pelo parasita, porém, sem diferença entre os grupos. No 12º dia os animais de todos os grupos atingiram o maior valor de média diária de escores, sem diferença significativa entre os grupos. No 14º dia os grupos tratados com concentrações de 10 e 30µg de EGS (Extrato de Glândula Salivar) tiveram diferenças significativas em relação ao controle (FIGURA 4).

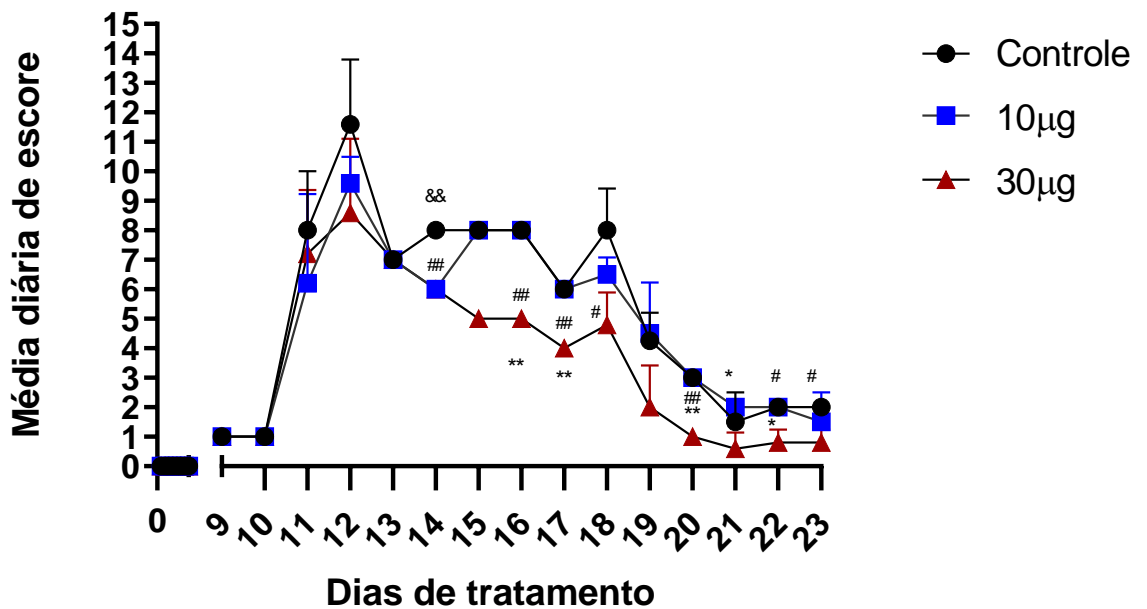
Nos dias 16, 17, 20 e 22 de tratamento, o grupo tratado com 30µg de EGS obteve menores médias diárias de escores, em comparação aos grupos tratado com 10µg de EGS e controle, sendo a diferença estatisticamente significativa (FIGURA 4). No decurso do 21º dia de tratamento, o grupo tratado com 30µg de EGS obteve a menor média diária de escores, no entanto apresentou diferença significativa apenas com o grupo tratado com 10µg. Já no último dia de tratamento, o grupo tratado com 30µg de EGS apresentou média diária de escores significativamente menor que o grupo controle (FIGURA 4).

À partir do dia 18 de tratamento, os grupos apresentam redução da média diária de escores marcada pela redução dos sintomas da infecção oral de *T. gondii* (FIGURA 4).



Analisando todo decorrer do tratamento, podemos observar que todos os animais apresentaram sintomas da infecção, apresentando aumento e redução da média diária de escores ao longo do período. Apesar disso, à partir do dia 15, o grupo tratado com 30 $\mu$ g de saliva obteve a menor média diária de escores (FIGURA 4).

**Figura 4:** Variação de média diária de escores (fezes, atividade, pelagem, postura e hidratação) de morbidade em animais C57BL/6 infectados oralmente com 20 cistos de *T. gondii* (cepa ME-49) Dados foram analisados pelo *one-way* ANOVA, com teste de comparações múltiplas de Sidak, (\*) diferenças significativas entre tratamento com diferentes concentrações de EGS (10 e 30 $\mu$ g); \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; (&) diferença entre controle e tratamento com 10 $\mu$ g de EGS, &&  $p < 0,01$ ; (#) diferença entre controle e tratamento com 30 $\mu$ g de EGS (# $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ ).



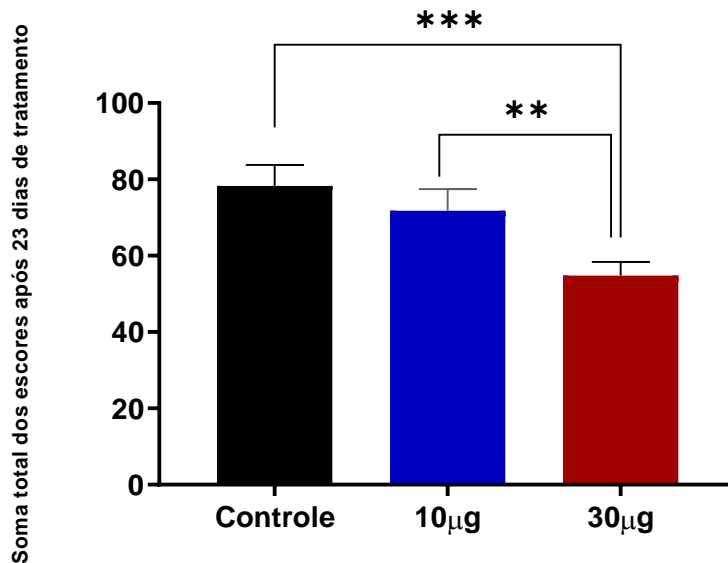
Fonte: Arquivo do Autor

## 5.2 SOMA TOTAL DOS ESCORES DE MORBIDADE NOS 23 DIAS DE TRATAMENTO COM SALIVA

Para verificar se o tratamento com EGS alterou os escores totais de morbidade causados pela infecção oral por *T. gondii* somaram-se os valores de escores obtidos diariamente durante os 23 dias de tratamento. As somas dos valores de escores obtidos foram: 78,25; 71,75 e 54,8 para os grupos controle, tratados com 10 $\mu$ g e 30 $\mu$ g de EGS, respectivamente (FIGURA 5). O grupo tratado com saliva na concentração de 30 $\mu$ g de EGS

apresentou média da soma total de escores significativamente menor que aos animais tratados com 10 $\mu$ g e do grupo controle (FIGURA 5).

**Figura 5:** Média da soma total de escores após 23 dias de tratamento com EGS em animais C57BL/6 infectados oralmente com 20 cistos de *T. gondii* (cepa ME-49). Os valores foram calculados por meio da soma total dos escores durante 23 dias. Cada grupo continha em 5 animais. Dados foram apresentados como média e desvio padrão e analisados pelo *one-way* ANOVA, com teste de comparações múltiplas de Sidak. (\*) diferenças significativas entre as médias dos grupos. \*\*p=0,01 e \*\*\*p=0,001



Fonte: Arquivo do autor

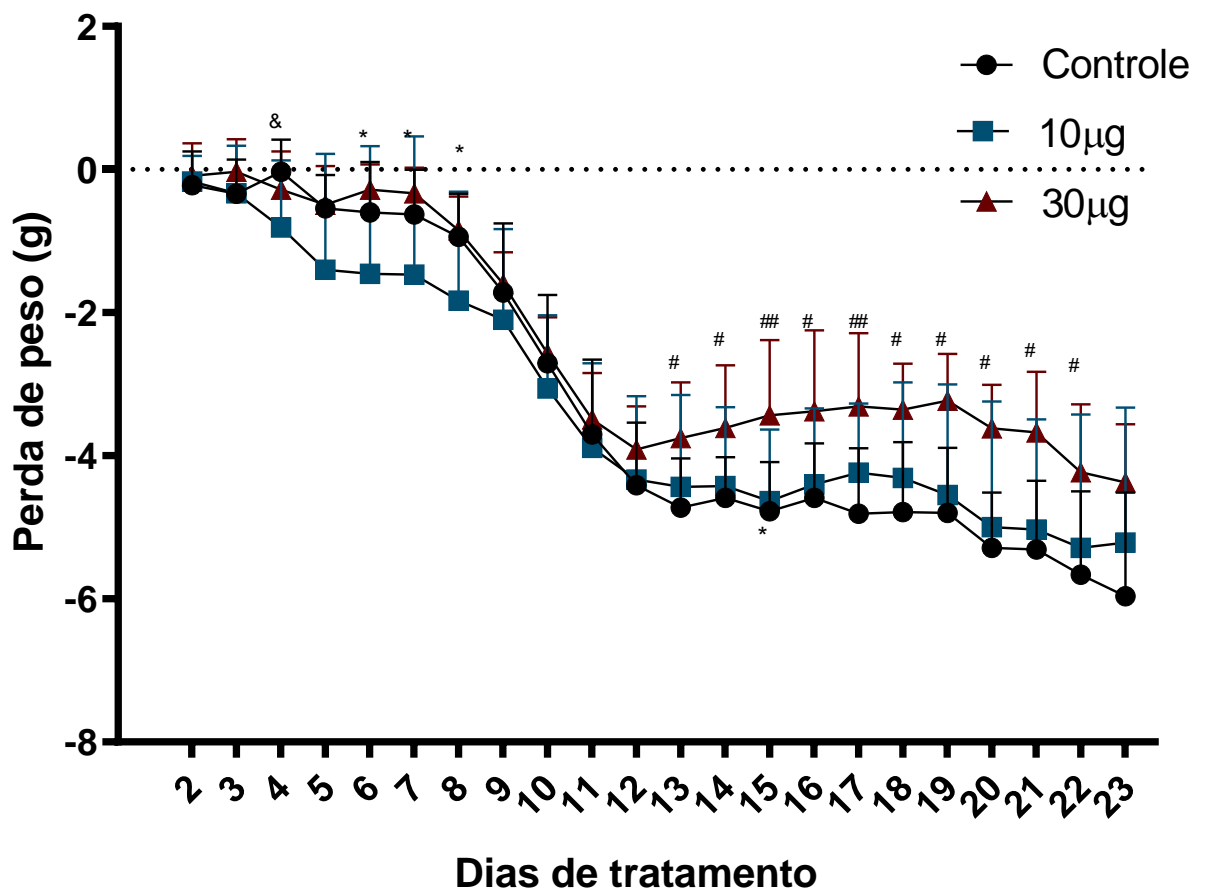
### 5.3 EFICÁCIA DO TRATAMENTO COM EGS NA REDUÇÃO DE PERDA DE PESO DURANTE A INFECÇÃO

Durante os 23 dias de experimento foi medido o peso diário dos animais para verificar se o tratamento com EGS seria capaz de reduzir a perda de peso causada pela infecção por *T. gondii*. Todos os grupos tiveram perdas de peso devido à infecção por *T. gondii*, no entanto o grupo tratado com concentração de 30 $\mu$ g de EGS obteve menor redução de peso na maior parte dos períodos analisados (FIGURA 6).

Do segundo dia de experimento até o 11º dia de tratamento com EGS, o grupo tratado com 10 $\mu$ g de EGS foi o que mais perdeu peso. No 3º dia, esta diferença foi significativa em relação ao controle. No decorrer dos dias 5, 6, 7 e 14 houve diferenças significativas de perda

de peso entre os grupos tratados com 10 $\mu$ g e 30 $\mu$ g de EGS. Dos dias 12 ao 21 o grupo tratado com 30 $\mu$ g de EGS obteve menor redução de peso em relação ao grupo controle (FIGURA 6).

**Figura 6:** Variação de perda de peso em animais C57BL/6 infectados oralmente com 20 cistos de *T. gondii* (cepa ME-49). O monitoramento foi realizado diariamente durante 23 dias e os resultados foram apresentados como média dos dados obtidos de 10 animais por grupo em dois experimentos independentes. Dados foram analisados pelo *one-way* ANOVA, com teste de comparações múltiplas de Sidak, (\*) diferenças significativas entre tratamento com diferentes concentrações de EGS (10 e 30 $\mu$ g); \* $p < 0,05$ ; (&) diferença entre controle e tratamento com 10 $\mu$ g de EGS, (&  $p < 0,05$ ); (#) diferença entre controle e tratamento com 30 $\mu$ g de EGS ( $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ ).

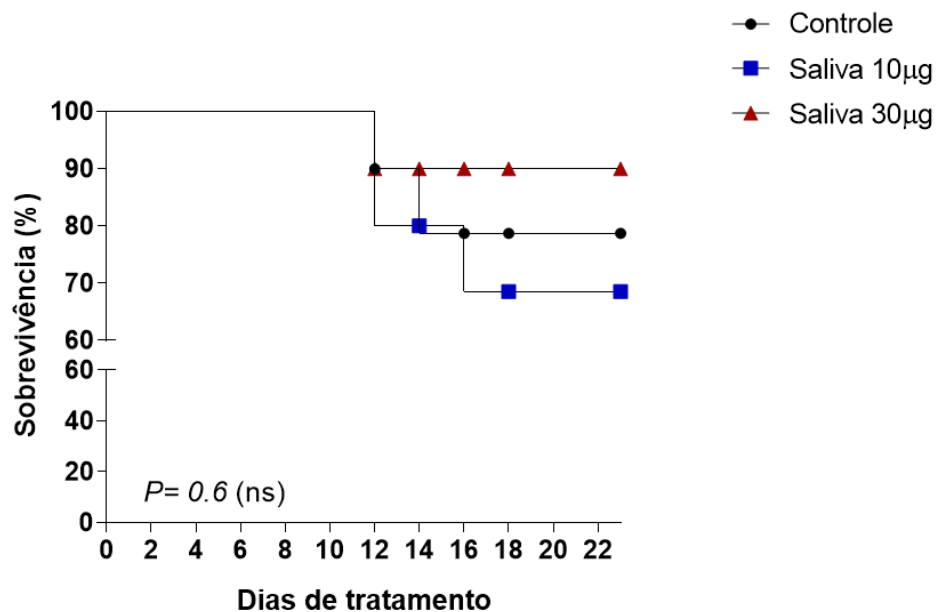


Fonte: Arquivo do Autor

#### 5.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM EGS NA SOBREVIVÊNCIA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Com intuito de verificar se o tratamento com EGS diminuiria a taxa de mortalidade entre os grupos, realizou-se uma curva de sobrevivência. No decorrer do experimento, ocorreram óbitos em todos os grupos, sendo observadas taxas de sobrevivência de: 79% para o grupo controle, 68% para o grupo tratado com 10 $\mu$ g de EGS e de 90% para o grupo tratado com 30 $\mu$ g de EGS (FIGURA 7). Embora não houve diferença estatística significativa, o grupo tratado com a maior concentração de saliva obteve o maior índice de sobrevivência.

**Figura 7** Gráfico de curva de sobrevivência em animais C57BL/6 infectados oralmente com 20 cistos de *T. gondii* (cepa ME-49). O monitoramento foi realizado diariamente durante 23 dias e os resultados foram apresentados como porcentagem de sobrevivência, dados obtidos de 10 animais por grupo em dois experimentos independentes. Dados foram apresentados como porcentagem de sobrevivência de Kaplan-Meier e analisados com teste de log-rank,  $p=0,6$  (ns = não significativo).

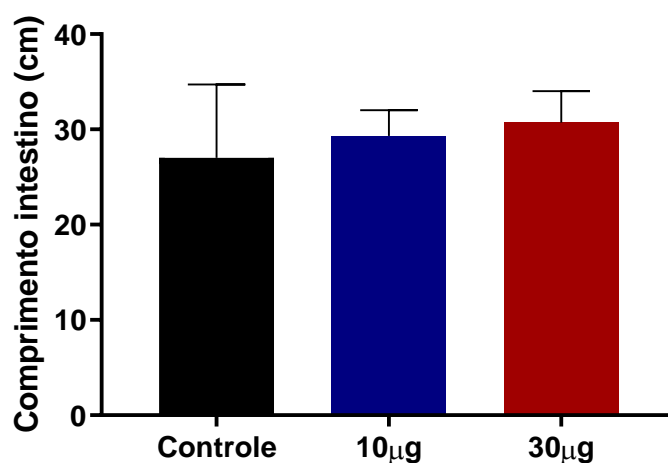


Fonte: Arquivo do Autor

## 5.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM EGS NO COMPRIMENTO INTESTINAL

Para verificar se os animais infectados com *T. gondii* tratados e não tratados com extrato de glândula salivar de *R. prolixus* tiveram alterações significativas no comprimento intestinal, mediu-se *in loco*, após a eutanásia, o comprimento total do intestino delgado. As médias de comprimento total do intestino foram: 27cm para o grupo controle, 29,3cm para o grupo tratado com 10 $\mu$ g de EGS e 30,7cm para o grupo tratado com 30 $\mu$ g. O grupo tratado com 30 $\mu$ g de EGS apresentou a maior média de comprimento de intestino. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (FIGURA 8). Ademais, visualmente os animais que foram tratados com o EGS (30 $\mu$ g) tinham o aspecto macromorfológico do intestino mais preservado que os animais do grupo controle.

**Figura 8:** Média de comprimento total do intestino delgado, medido *in loco*, após eutanásia. Camundongos C57BL/6 infectados oralmente com 20 cistos de *T. gondii* (cepa ME-49) foram tratados durante 23 dias com EGS. Os valores foram obtidos por meio da média e desvio padrão do comprimento do intestino dos animais. Os grupos controle, EGS 10 $\mu$ g e EGS 30 $\mu$ g foram constituídos por 8, 7 e 9 animais, respectivamente. Os dados foram obtidos de dois experimentos realizados de forma independente e analisados pelo *one-way* ANOVA, com teste de comparações múltiplas de Sidak.

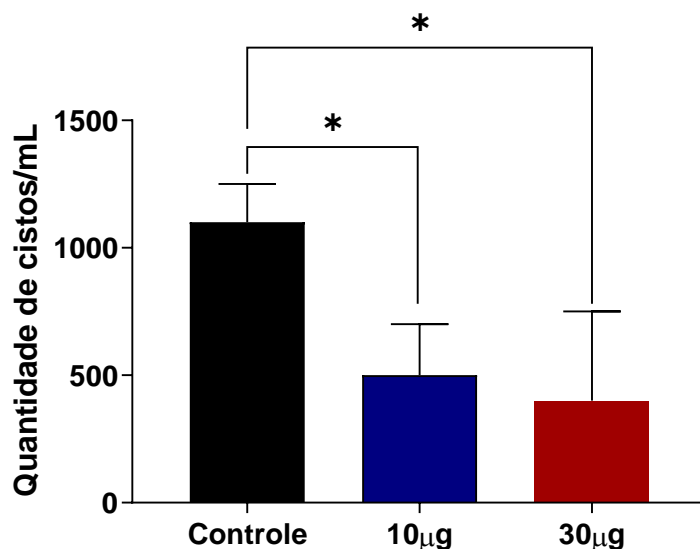


Fonte: Arquivo do Autor

## 5.6 EFEITO DO TRATAMENTO COM EGS NA CONTAGEM DE CISTOS EM MACERADOS DE CÉREBRO

Para avaliar se o tratamento interferiu no processo de formação de cistos de *T. gondii*, realizou-se a contagem de cistos em macerados de cérebro utilizando microscópio de luz. Os grupos tratados com 10 $\mu$ g e 30 $\mu$ g de EGS apresentaram contagem de cistos significativamente menores em relação ao grupo controle. O grupo controle apresentou média de 1100 cistos/mL, o grupo tratado com 10 $\mu$ g de EGS foi observado a quantidade média de 500 cistos/mL e o grupo tratado com 30 $\mu$ g de EGS foi encontrado uma média de 400 cistos/mL (Figura 9).

**Figura 9:** Média de quantidade de cistos em macerado de cérebro. Contagem realizada em microscópio de luz. Animais C57BL/6 infectados oralmente com 20 cistos de *T. gondii* (cepa ME-49) foram tratados durante 23 dias com EGS. Os valores foram obtidos por meio da média e desvio padrão da quantidade de cistos obtidos nos macerados de cérebro dos animais em 20 $\mu$ L de amostra e a seguir, estimou-se a quantidade de cistos em 1mL de solução. Os grupos controle, EGS 10 $\mu$ g e EGS 30 $\mu$ g foram constituídos por 8, 7 e 9 animais, respectivamente. Os dados foram analisados pelo *one-way* ANOVA, com teste de comparações múltiplas de Sidak.\*p < 0,05



Fonte: Arquivo do Autor

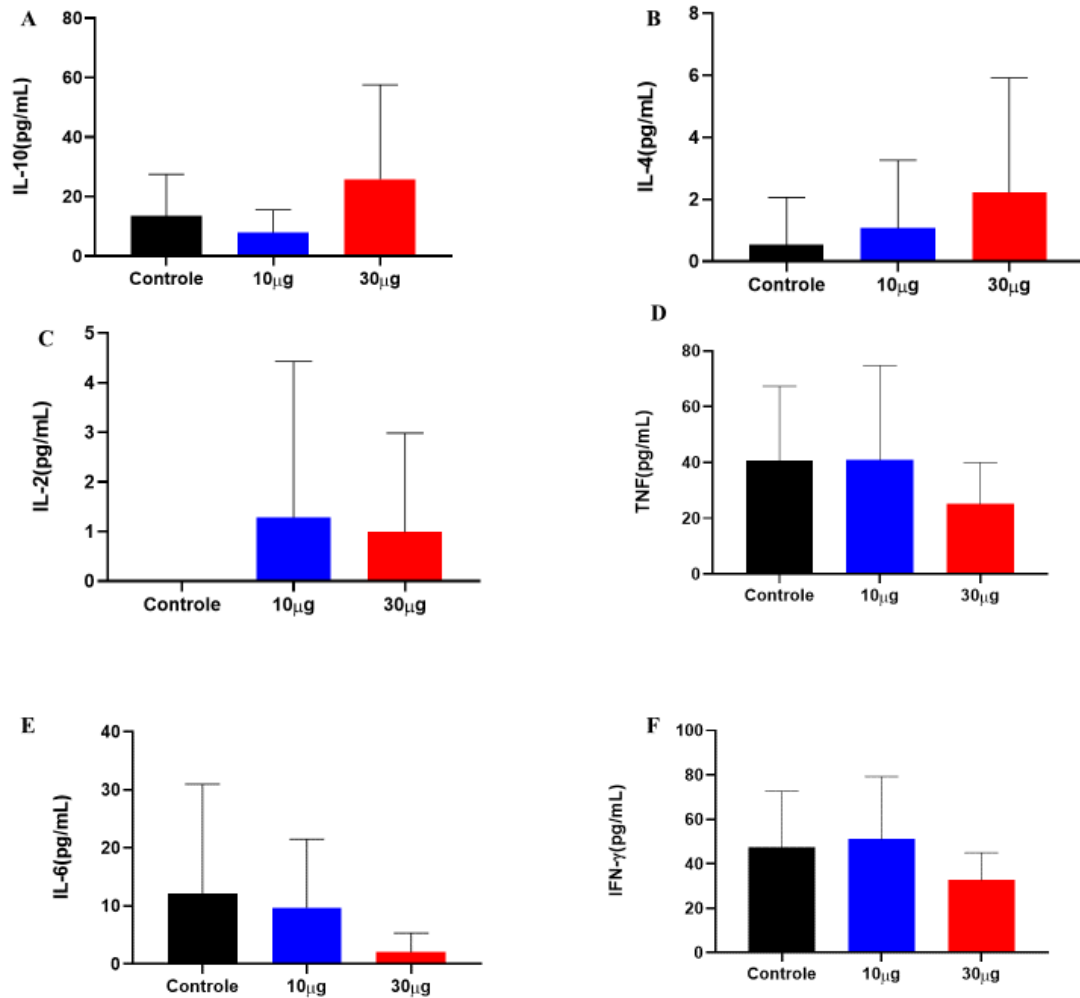
## 5.7 PRODUÇÃO DE CITOCINAS SÉRICAS

Para estimar se o tratamento promoveu diferenças na secreção de citocinas séricas entre os grupos durante a inflamação intestinal, realizou-se CBA para quantificar as citocinas secretadas de perfil Th1 (TNF, IFN- $\gamma$  e IL-6), Th2 (IL-4, IL-2 e IL-10) e Th17(IL-17). Não foi detectado no soro a citocina IL-17 em nenhum dos animais.

No que tange as citocinas de perfil anti-inflamatório, observou-se secreção média de 13,42; 7,99 e 25,9pg/mL de IL-10, para os grupos controle, tratado com EGS na quantidade de 10 $\mu$ g e 30 $\mu$ g, respectivamente, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (FIGURA 10A). Observou-se a secreção média de IL-4, nas quantidades 0,53; 1,06 e 2,22pg/mL para os grupos controle, tratado com EGS na quantidade de 10 $\mu$ g e 30 $\mu$ g, respectivamente, entretanto, sem diferença estatística entre os grupos (FIGURA 10B). Por fim, para a citocina IL-2, no grupo controle não foram detectados valores de secreções séricas, o grupo tratado com 10 $\mu$ g de EGS obteve secreções médias de 1,28pg/mL e o grupo tratado com 30 $\mu$ g de EGS obteve concentrações médias de 0,98pg/mL (FIGURA 10C).

Referente as citocinas de perfil inflamatório, não encontramos nenhuma diferença estatística de secreção nos grupos analisados. Observou-se para a citocina TNF a secreção média de 40,74; 40,88 e 25,10pg/mL para os grupos controle, tratado com 10 $\mu$ g e 30 $\mu$ g de EGS, respectivamente (FIGURA 10D). Para a citocina IFN- $\gamma$  observamos secreção média de 47,51pg/mL para grupo controle, 51,09pg/mL para o grupo tratado com 10 $\mu$ g de EGS e 32,71pg/mL para o grupo tratado com 30 $\mu$ g de EGS (FIGURA 10E). Para IL-6 obteve-se os valores médio de secreção de 12,16pg/mL para o grupo controle, 9,72pg/mL para o grupo tratado com 10 $\mu$ g de EGS e 2,05pg/mL para o grupo tratado com 30 $\mu$ g de EGS (FIGURA 10F).

**Figura 10:** Média da quantidade de citocinas séricas secretas. Valores obtidos por ensaio CBA. Em (A) IL-10, (B) IL-4, (C) IL-10, (D)TNF, (E) IL-6 e (F)IFN- $\gamma$  Animais C57BL/6 infectados oralmente com 20 cistos de *T. gondii* (cepa ME-49) foram tratados durante 23 dias com EGS. Os valores foram obtidos por meio da média e desvio padrão da quantidade de citocina sérica secretada. Os grupos controle, EGS 10 $\mu$ g e EGS 30 $\mu$ g foram constituídos por 8, 7 e 9 animais, respectivamente. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, com teste de comparações múltiplas de Dunn.



Fonte: Arquivo do Autor

## 5.8 ANIMAIS ALTO PRODUTORES DE CITOCINAS SÉRICAS

Com o objetivo de analisar as diferenças de secreção sérica de citocinas entre os grupos, foi feita uma análise para evidenciar os animais altos produtores de citocinas em cada situação experimental. Para isso, foi feito a mediana global de produção de cada citocinas



considerando todos os grupos experimentais. Aqueles animais que obtiveram valores de secreção maiores que a mediana global foram considerados altos produtores de citocinas. Após, foi feita uma análise de porcentagem, definindo a porcentagem de animais altos produtores de citocinas em cada grupo experimental e os resultados foram plotados em gráficos do tipo radar.

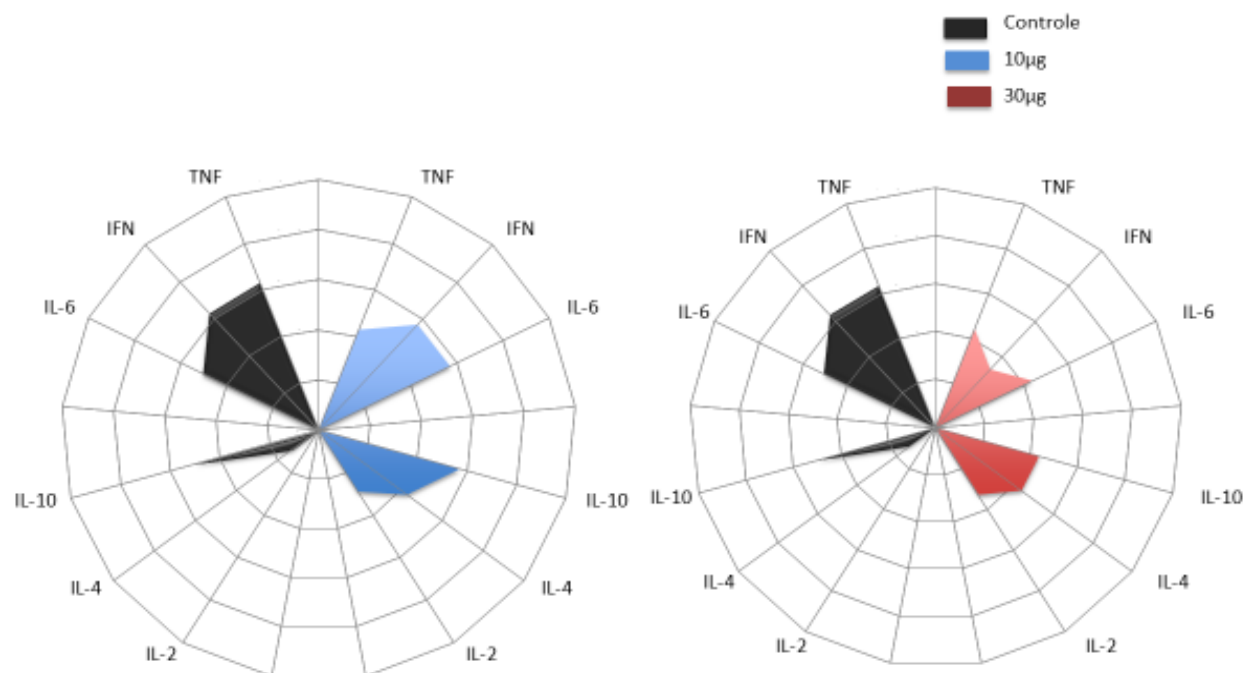
Tangente à citocina TNF, foram altos produtores de citocinas, 63% dos animais do grupo controle, 43% dos animais tratados com 10 $\mu$ g de EGS e 44% dos animais tratados com 30 $\mu$ g de EGS. Concernente à citocina IFN- $\gamma$ , os grupos controles e tratados com 10 $\mu$ g e 30 $\mu$ g de EGS, apresentaram 63%, 57% e 33% de camundongos altos produtores de citocinas respectivamente. Além disso, 50% dos animais do grupo controle, 57% dos animais do grupo tratado com 10 $\mu$ g EGS e 44% dos animais do grupo tratado com 30 $\mu$ g de EGS, foram determinandos como altos produtores de IL-6 (FIGURA 12).

Para a citocina IL-4, 13% do grupo controle, 43% do grupo tratado com 10 $\mu$ g de EGS e 44% do grupo tratado com 30 $\mu$ g de EGS foram considerados animais alto produtores de citocinas. Por fim, referente a citocina IL-10 foram considerados altos produtores de citocinas, 50%, 57% e 44%, dos grupos controle, tratados com 10 $\mu$ g e 30 $\mu$ g de EGS, respectivamente. Para a citocina IL-2 os grupos controle, tratados com 10 $\mu$ g e 30 $\mu$ g de EGS, apresentaram 0%, 29% e 33% de animais altos produtores de citocinas respectivamente.(FIGURA 12).

Observamos que tangente às citocinas pró-inflamatórias, o grupo tratado com 30 $\mu$ g de EGS apresentou as menores quantidade de animais altos produtores de IL-6 e IFN- $\gamma$ . O grupo tratado com EGS na quantidade de 10 $\mu$ g obteve as maiores porcentagens de animais altos produtores de IL-6 e menores porcentagem de altos produtores de TNF. Já o grupo controle foi observado as maiores taxas de animais altos produtores de citocinas IFN- $\gamma$  e TNF (FIGURA 12).

Referente as citocinas anti-inflamatórias o grupo tratado com 30 $\mu$ g de EGS registrou a maior quantidade de animais altos produtores de IL-4 e o grupo tratado com 10 $\mu$ g de EGS foi observado a maior quantidade de camundongos altos produtores de IL-10. além disso o grupo registrou as maior quantidade de animais altos produtores de IL-2 O grupo controle teve as menores porcentagens de animais altos produtores de IL-4 e IL-10. Ademais, o grupo controle não apresentou animais produtores de IL-2 (FIGURA 12).

**Figura 12:** Gráficos de assinaturas de citocinas séricas, demonstrando porcentagem de animais altos produtores de IL-6, TNF, IFN, IL-10, IL-4 e IL-2 nos grupos experimentais. Animais C57BL/6 infectados oralmente com 20 cistos de *T. gondii* (cepa ME-49) foram tratados durante 23 dias com EGS. Foram considerados animais altos produtores de citocinas, aqueles animais que registraram valores de secreção de citocinas superiores à mediana global calculada com base em todo o universo de dados de cada citocina. Os grupos controle, EGS 10 $\mu$ g e EGS 30 $\mu$ g foram constituídos por 8, 7 e 9 animais, respectivamente.



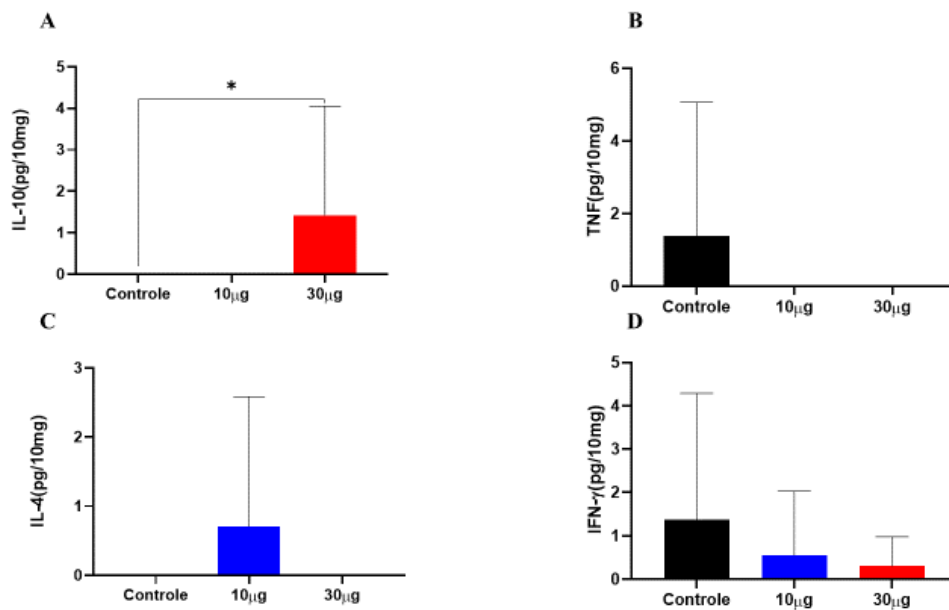
Fonte: Arquivo do Autor

## 5.9 PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO INTESTINO

Para saber se o tratamento com EGS foi capaz de modular a secreção de citocinas no intestino, foi feito CBA em homogenato de tecido intestinal. Não foram detectados no intestino secreção de citocinas IL-2, IL-17 e IL-6. No tocante à citocina IL-10, no grupo

tratado com 30 $\mu$ g de EGS foi observado uma média de secreção de 1,42pg/mL, a única média superior a zero e com diferença significativa em relação ao grupo controle (FIGURA 13A). TNF somente foi registrada secreção no grupo controle, com valores médios de secreção de 1,38pg/mL, sem diferença significativa com os outros grupos (FIGURA 13B). Referente à IL-4, somente o grupo tratado EGS na quantidade de 10 $\mu$ g foi observado secreções médias, registrando valores médios de 0,70pg/mL (FIGURA 13C). Para IFN- $\gamma$  foram observados os valores médios de secreção de citocina de 1,37; 0,55 e 0,30pg/mL para os grupos controle e tratados com 10 $\mu$ g e 30 $\mu$ g de EGS, respectivamente (FIGURA 13D).

**Figura 13:** Média da quantidade de citocinas secretadas no intestino. Valores obtidos por teste de CBA em 10mg de tecido intestinal e amostras diluídas 5x. Em (A) IL-10, (B)TNF, (C) IL-4 e (D) IFN- $\gamma$ . Animais C57BL/6 infectados oralmente com 20 cistos de *T. gondii* (cepa ME-49) foram tratados durante 23 dias com EGS. Os valores foram obtidos por meio da média e desvio padrão da quantidade de citocina sérica secretada. Os grupos controle, saliva 10 $\mu$ g e saliva 30 $\mu$ g foram constituídos por 8, 7 e 9 animais, respectivamente. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, com teste de comparações múltiplas de Dunn. \*p<0,05



Fonte: Arquivo do Autor

## 6 DISCUSSÃO

O intestino participa ativamente dos processos de digestão e absorção dos nutrientes. Este órgão forma a maior barreira do nosso organismo, dividindo a interface do lúmen e a interface da circulação. A barreira ao longo do período evolutivo se tornou complexa, adquirindo vários mecanismos de defesa que asseguram sua função. Inúmeros componentes trabalham juntos, evitando que patógenos aproveitem os nutrientes do lúmen, ou invadam a circulação causando doenças e danos ao hospedeiro (TURNER, 2009; YOUNGBLUT et al., 2019). Entretanto, apesar da especializada habilidade de defesa desta barreira, alguns microrganismos coevoluiram e aumentaram sua capacidade de invasão. Um destes microrganismos é *T. gondii*, protozoário que possui vários mecanismos de invasão de barreiras e de evasão do sistema imune (EBERT, 2008; JU; CHOCKALINGAM; LEIFER, 2009).

A barreira intestinal possui inúmeras vantagens para os organismos que a possuem. Não obstante, este componente pode ser precursor de doenças e morbidades caso a regulação da resposta imunológica não seja eficiente, tolerante e autoregulada. Camundongos C57BL/6 ao serem infectados por *T. gondii* de forma oral, exibem uma resposta imunológica exacerbada, não regulada e depletiva. Devido a este evento, a barreira se encontra comprometida não realizando com eficiência suas atividades fisiológicas e imunológicas (GREGG et al., 2013).

A quebra da homeostasia intestinal é observada também na doença de Chron. A doença é exibida através de resposta imune do tipo Th1 exacerbada e não regulada, assim como é observado em modelos de infecção oral por *T. gondii* em animais C57BL/6. Uma forma de tratar este quadro de inflamação exacerbada é através de imunoterapia. Atualmente, os fármacos disponíveis são de alto custo e alguns pacientes sofrem com efeitos colaterais. Desta forma, é importante a busca por novos princípios ativos ou substâncias capazes de combater o quadro inflamatório sem causar danos ao paciente. Assim, a saliva de insetos hematófagos surge como potencial alternativa de tratamento de inflamações exacerbadas no intestino, por sabidamente possuir propriedades anti-inflamatórias. A saliva pode fornecer um novo imunoregulador para tratar doenças inflamatórias, fornecendo um componente regulatório para os processos inflamatórios exacerbados (PITHADIA; JAIN, 2011; SHANAHAN, 2002; TITUS; BISHOP; MEJIA, 2006).

No nosso estudo utilizamos animais C57BL/6 e os infectamos oralmente com 20 cistos de *T. gondii*. Os nossos resultados mostraram que o tratamento com EGS na concentração de 30 µg foi eficiente ao reduzir por vários dias a média de escores de morbidade causados pela infecção. Foi observada também, a redução da soma total de escores durante os 23 dias de tratamento nos animais tratados com 30µg de EGS. Após a invasão do epitélio intestinal por *T. gondii*, ocorre o desencadeamento de uma resposta imunológica robusta do tipo Th1. Alguns linfócitos T atuam mediando a necrose, promovendo assim mudanças histopatológicas e alterando a atividade fisiológica e imunológica do órgão. Além disso, há uma robusta sinalização para produção de mediadores inflamatórios como óxido nítrico, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  (LIESENFELD et al., 1996, 1999). Mediadores que, em excesso, participam da depleção estrutural do órgão e promove alteração na homeostasia do organismo (HANAUER, 2006). À partir destas premissas, observamos que a saliva foi eficiente em reduzir a inflamação exacerbada, diminuindo assim, os sinais clínicos (diminuição da defecação, alterações etológicas, modificação da pelagem, deformação da postura e desidratação) causados pelo processo inflamatório nos grupos tratados.

Em outros trabalhos, induzindo inflamação intestinal em animais C57BL/6 com dextran sulfato de sódio, foi observado que animais tratados com concentração de EGS de 30µg tiveram redução significativa no valor diário de score em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com concentração de 3 µg de EGS. Além disso, a redução da inflamação foi obtida por meio da modulação local de citocinas, aumentando a produção de IL-10 que possui atividades anti-inflamatórias e reduzindo a produção de IL-6 que possui atividades pró-inflamatórias (SALES-CAMPOS et al., 2018). Muitos fármacos que existem hoje para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais agem por meio de anticorpos que neutralizam citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ . Portanto, a modulação da resposta imune se configura como um bom caminho para o tratamento destas doenças (COLOMBEL et al., 2007).

No presente estudo foi observado que os animais tratados com 30µg de EGS tiveram a menor perda de peso que animais do grupo controle em vários dias de tratamento. O intestino delgado participa ativamente do processo de absorção de nutrientes. Para exercer sua função de absorção com excelência, o órgão possui diversas estruturas que são essenciais e contribuem para a realização eficiente da atividade fisiológica. A área deste órgão é significativamente aumentada pela presença de vilosidades e microvilosidades, que aumentam a área de superfície intestinal em 30 a 600 vezes, respectivamente, contribuindo assim para maximização da absorção (KIELA; GHISHAN, 2016). Apesar disso, quando induzida a

infecção oral por *T. gondii*, a intensa inflamação do tipo Th1 leva a redução e encurtamento das vilosidades, prejudicando assim, a atividade fisiológica do órgão. A depleção das vilosidades leva à má absorção de nutrientes que levará à perda de peso (EGAN; COHEN; DENKERS, 2012).

Ademais, muitos outros nutrientes são transportados por processos biofísicos que dependem da membrana da célula, necessitando da homeostasia deste componente celular. No entanto, durante a inflamação intestinal por *T. gondii* é observado intensa necrose e destruição celular, prejudicando a atividade fisiológica normal do intestino (LIESENFELD, 2002).

No decurso do processo inflamatório as bactérias do intestino exercem um papel fundamental na patologia da inflamação intestinal causada por *T. gondii*, o processo imunológico desregulado causado pela infecção pelo parasita, leva a um desbalanço na microbiota intestinal (XAVIER; PODOLSKY, 2007). Deste modo, durante o processo inflamatório é observado uma mudança da microbiota de um perfil gram-positivo, para um perfil gram-negativo constituído principalmente por bactérias enteroadesivas (DARFEUILLE-MICHAUD et al., 2004). Estas bactérias gram-negativas translocam pelas lesões da barreira intestinal, que são causadas pelo processo inflamatório exacerbado promovido pela infecção por *T. gondii*. Neste quadro patológico, os antígenos bacterianos translocados alimentam uma massiva resposta Th1, que leva à efeitos colaterais intensos e contribuem para ampliação da degradação da barreira (HANS et al., 2000).

Desta forma, é observado que, ao administrar o EGS na concentração de 30µg reduziu-se o processo inflamatório exacerbado, levando a menor degradação dos componentes do intestino favorecendo o processo de absorção de nutrientes. Além disso, a redução da inflamação pode levar a um menor desbalanço na microbiota, reduzindo os efeitos patológicos do processo inflamatório.

No presente trabalho observou-se que, o grupo tratado com a maior concentração de EGS teve a menor taxa de mortalidade. A resposta imune reguladora tem um papel importante na resposta da mucosa a *T. gondii*. Uma citocina importante que participa do processo de regulação da resposta imune perante ao parasita é IL-10. A importância desta citocina está relacionada à prevenção do processo imunopatológico. Camundongos *knockout* para IL-10 são mais suscetíveis à infecção induzida oralmente por *T. gondii*, possuindo uma patologia mais grave e sobrevivência reduzida (SUZUKI et al., 2000). Além disso, em animais *knockout* para IL-10 ocorre um aumento na produção endógena de IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$

(SCHARTON-KERSTEN et al., 1996). Trabalhos anteriores demonstram que a saliva dos triatomíneos inibem perfil de resposta Th1, exercendo um papel imunológico semelhante à citocina IL-10 (MENDES et al., 2016). Portanto, ao se modular negativamente a resposta inflamatória exacerbada, reduziu-se o processo patológico intenso que levariam os animais à morte.

Um dos aspectos da patologia que leva os animais a morte é a translocação bacteriana, pois este processo contribui alimentando massivamente a resposta imune Th1. Estudos demonstraram que em animais *germ-free* a doença se desenvolve de forma mais branda (HEIMESAAT et al., 2006). A inflamação exacerbada causada pela infecção de *T. gondii* leva a depleção das bactérias simbióticas do intestino. Desta forma, em semelhança às DII humanas, a infecção pelo parasita funciona como um gatilho inicial para a quebra da tolerância imunológica perante a microbiota (COUTURIER-MAILLARD et al., 2018). A microbiota intestinal tem papéis essenciais para o hospedeiro como a produção de bacteriocinas e a modulação de produção de citocinas, contribuindo para a defesa da barreira. Quando as bactérias simbióticas são atacadas pelo sistema imune é dada a oportunidade para colonização do intestino por bactérias possivelmente patogênicas (ROOKS; GARRETT, 2016). Desta forma, acreditamos que ao tratar os animais com EGS modulamos a resposta imune exacerbada que causaria danos a microbiota, levaria à exacerbação do processo inflamatório e posteriormente a morte dos animais. Estudaremos futuramente melhor a relação do EGS com a modulação da microbiota, entendendo melhor os papéis dos componentes salivares.

Em trabalhos realizados na fase aguda da inflamação causada pelo dextran sulfato de sódio, foi observada redução significativamente maior do intestino do grupo controle em relação aos grupos tratados (CHAPMAN-KIDDELL et al., 2010; SALES-CAMPOS et al., 2018). No nosso trabalho (fase crônica da infecção), apesar da média de comprimento intestinal ser menor no grupo controle, não encontramos diferenças significativas entre os grupos. Diferentemente da fase aguda, em que o intestino está em seu maior estado de inflamação, na fase crônica é observada a redução do processo inflamatório. Portanto, esta situação pode ter interferido na diferença de resultados obtido nos dois estudos.

No nosso trabalho animais do grupo controle infectados oralmente por *T. gondii* foi observado um número maior de cistos no cérebro em comparação aos grupos tratados com EGS. Durante a infecção por *T.gondii*, as citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1,

principalmente IFN- $\gamma$  e IL-12, exercem um papel importante no combate à infecção promovendo a resistência do hospedeiro à infecção (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011; TAIT; HUNTER, 2009).

A citocinas pró-inflamatórias de perfil Th1 promovem diversos efeitos danosos nos animais C57BL/6 infectados oralmente por *T. gondii*. Apesar disso, trabalhos demonstram que animais tratados com anticorpos que neutralizam a citocina IL-12 e animais *knockouts* para IL-12, possuem a produção de IFN- $\gamma$  reduzida. Desta forma, estes animais ficam mais suscetíveis a infecção por *T. gondii*. Reprimir a resposta do tipo Th1 nem sempre é bom para o hospedeiro, tanto que o parasito pode modular negativamente a síntese de IL-12, deprimindo a resposta imunológica do tipo Th1 e favorecendo assim sua replicação (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008). A citocina IFN- $\gamma$  é importante para a geração e manutenção dos cistos com bradizoítos e sua manutenção (SUZUKI et al., 2010). Assim, é provável que ao tratar os animais com a saliva reduzimos o processo patológico junto aos sinais clínicos gerados pelo processo inflamatório exacerbado, e, modulamos uma resposta imune que favorece o processo de encistamento do parasito. Portanto, é provável que os grupos tratados com EGS exibem menor quantidade de cistos por possuir uma resposta imunológica que incentiva a replicação dos taquizoítos e a redução da formação de cistos.

O nosso modelo de DII utiliza um parasita capaz também de modular as repostas imunes ao seu favor, diferentemente de outros trabalhos que utilizam indutores químicos de ileíte. *T. gondii* pode estimular através da proteína de roptria ROP16 a ativação de macrófagos na fase inicial, estimulando a produção de IL-4 e IL-10, portanto promovendo uma resposta Th2. Apesar disso, durante a inflamação intestinal em animais C57BL/6, a translocação de antígenos bacterianos para a circulação alimenta uma massiva resposta do tipo Th1 (MAMMARI et al., 2019). Ao adicionarmos o tratamento com a saliva estamos contribuindo para a imunomodulação que pode diminuir os efeitos colaterais, mas por outro lado pode contribuir para a proliferação do parasita e estender a fase aguda do parasita, visto que a resposta Th1 é necessária para o início da fase crônica.

Ainda é possível inferir que a redução na quantidade de cistos observada no presente estudo esteja associado com a preservação da barreira intestinal devido ao balanço do processo inflamatório. A manutenção da integridade da barreira intestinal pode refletir em uma menor quantidade de parasitos capazes de atravessar a barreira, difundir sistemicamente



e alcançar o tecido cerebral, repercutindo na menor quantidade de cistos, conforme observado no presente estudo. Novos estudos são necessários para confirmação desta hipótese.

Após análises de citocinas por CBA, vimos que não houveram nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos do experimento na secreção de citocinas séricas. Apesar disso, o grupo tratado com EGS na quantidade de 30 $\mu$ g apresentou as menores médias de secreção de citocinas séricas pró-inflamatórias (Th1) e as maiores médias de secreção para citocinas anti-inflamatórias (Th2). Supomos a ausência de diferença significativa na secreção de citocinas séricas seja explicada pela fase de infecção que os animais se encontram, já que os animais tiveram redução considerável da morbidade e dos efeitos colaterais deletérios no momento da eutanásia. Pretendemos elucidar melhor futuramente em novos estudos a secreção das citocinas na fase aguda.

O ectoparasitismo promovido pelos insetos hematófagos expõe os hospedeiros sucessivas vezes aos antígenos da saliva, que são essenciais, pois evitam a coagulação, inibem a acumulação de plaquetas e promovem a vasodilatação. Por outro lado, a exposição demasiada aos antígenos da saliva leva ao desenvolvimento de uma resposta imune de resistência, do tipo Th1, com produção significativa de IFN- $\gamma$  e IL-12, semelhante à resposta imunológica causada pela infecção por *T. gondii* (GILLESPIE et al., 2001). A alimentação se consolida como um pilar essencial para sobrevivência do indivíduo e sobretudo da espécie, desta forma, os insetos hematófagos ao longo do processo evolutivo precisaram se dotar de um complexo arsenal molecular imunomodulador, para poder modular negativamente a resposta Th1 que prejudicaria o repasto sanguíneo (SCHOELER; WIKEL, 2001). As moléculas agem de variadas formas, promovendo uma resposta do tipo Th2, e agindo negativamente contra células imunológicas e componentes do sistema imune. A saliva de *R. prolixus*, por exemplo, pode agir inibindo as vias clássica e alternativas do complemento (MENDES et al., 2016). A partir dessas premissas, a saliva no nosso estudo pode agir como imunomodulador diminuindo as repostas exacerbadas do tipo Th1 e por consequência os efeitos colaterais deletérios da doença.

No início da infecção por *T. gondii* o parasita induz a produção de IL-12 que age juntamente com TNF- $\alpha$  para induzir a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK, após isso, outras células da imunidade, como os linfócitos, são recrutadas (SHER et al., 1993). A saliva pode modular esta resposta inicial, visto que a função imunomoduladora do EGS age negativamente contra células imunes e citocinas pertencentes à resposta Th1. Esta condição

pode ser vista pela diminuição sem diferença estatística, da secreção média de citocinas séricas inflamatórias no grupo tratado com a maior quantidade de EGS, e o aumento da secreção de IL-4 e IL-10. Presumimos que na fase aguda da doença estas diferenças de secreção de citocinas séricas estão mais intensificadas, visto que nessa fase observamos diferenças estatística de perda de peso e de escores clínicos.

Quando analisamos os animais alto produtores de IFN- $\gamma$  e TNF, os tratados com EGS na quantidade de 30 $\mu$ g foram os que menos produziram estas citocinas séricas, já o grupo controle concentra em maior quantidade os animais altos produtores destas citocinas pro-inflamatórias. O grupo tratado com EGS na quantidade de 30 $\mu$ g acumula os animais que mais produziram IL-4, citocina pertencente a resposta Th2. Podemos presumir que saliva modulou a resposta imune, apesar da ausência de diferença significativa entre os grupos.

Os animais tratados com EGS foram os únicos que apresentaram a secreção de IL-2, estudos demonstram que esta citocina pode possuir um papel anti-inflamatório. Foi observado que a citocina IL-2 é responsável por permitir a geração e a sobrevivência de população de células Treg, que são população de células T importantes, envolvidas na regulação de processos inflamatórios e essenciais na prevenção no desenvolvimento de doenças autoimunes (SHACHAR; KARIN, 2013). IL-2 promove o desenvolvimento de células Treg através da ativação por STAT5, que se liga ao locus Foxp3<sup>+</sup> e promove a expressão Foxp3<sup>+</sup>. Animais que são nocautes para IL-2 falham na manutenção da tolerância periférica e desenvolvem doenças autoimunes, desta forma vemos que IL-2 é uma citocina essencial no combate das doenças autoimunes. Além disso foi observado que IL-2 possui um papel essencial na diferenciação de população de linfócitos T e B da resposta Th2 simultaneamente com IL-4 (COTE-SIERRA et al., 2004). Desta forma, dado a ausência de secreção no grupo controle, presumimos que a citocina IL-2 no estudo possa estar trabalhando para a resposta regulatória, reduzindo a resposta imune exacerbada do tipo Th1.

Ao analisarmos a produção de citocinas local no intestino, observamos diferença significativa de produção de IL-10 no grupo tratado com 30 $\mu$ g de EGS em relação ao grupo controle. A citocina IL-10 é um importante componente anti-inflamatório da imunidade, prevenindo a resposta imune exacerbada, evitando danos ao hospedeiro e sobretudo restabelecendo a homeostasia. Deficiências na produção de IL-10 pode exacerbar as resposta imunológicas contra antígenos antimicrobianos e levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como as doenças inflamatórias intestinais (SELLON et al., 1998). Na infecção

intestinal por *T. gondii*, IL-10 possui um papel importante, estudos demonstram que a ausência de produção de IL-10 endógena, em animais C57BL/6 promove uma resposta imune do tipo Th1 letal, dependente de células T CD4<sup>+</sup> e acompanhada de superprodução de IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ . Desta forma, a ausência de IL-10 leva os animais ao desbalanceamento ainda maior da resposta imune, intensificando a inflamação intestinal. No nosso estudo ao observamos a produção significativa de IL-10 no intestino, acreditamos que esta citocina foi induzida pelo tratamento com EGS. Ao aumentar a quantidade de IL-10 local no intestino, atenuamos a resposta imune exacerbada de tipo Th1, reduzindo os efeitos colaterais da doença e aumentando a sobrevivência dos animais.

O grupo tratado com a maior quantidade de EGS obteve também, as menores médias de secreções de citocinas pró-inflamatórias no intestino. Em contrapartida, TNF e IFN- $\gamma$  foram detectadas em maior quantidade no grupo controle. TNF se consolida como um pilar importante da doença inflamatória intestinal, pois esta citocina é altamente pró-inflamatória e um importante recrutador da imunidade celular (VANDENABEELE et al., 1995). Camundongos geneticamente modificados, denominados TNF <sup>$\Delta$ ARE</sup> são desenhados para superproduzir a citocina TNF- $\alpha$  e desenvolvem uma patologia semelhante a doença de Crohn (PIZARRO et al., 2003). Para o tratamento da doença de Crohn bloqueadores de TNF são comumente utilizados, visto que esta citocina é um importante componente alimentador da inflamação (MONACO et al., 2015). Apesar de existir drogas anti-TNF, logo de início estes medicamentos não respondem de forma eficiente em cerca de 30% dos pacientes. Além disso, mais da metade dos pacientes ao longo do primeiro ano param de responder de forma eficaz perante a droga (ADEGBOLA et al., 2018). Desta forma, nosso estudo se mostra promissor, visto haja necessidade de novas drogas para o tratamento da doença de Crohn.

Apesar do IFN- $\gamma$  ser uma citocina essencial para o combate da proliferação de *T. gondii*, esta citocina é uma das principais responsáveis por estimular o processo inflamatório intestinal exacerbado. Em modelos de colite induzidos por dextran sulfato de sódio e utilizando camundongos C57B/6, foi observado, robusta produção de IFN- $\gamma$ , perda de peso e altas taxas de mortalidade. Já em animais *knockout* para IFN- $\gamma$  foi visto que, após a exposição ao dextran sulfato de sódio os animais não desenvolvem a colite e tampouco há redução de peso e mortalidade (ITO et al., 2006). Desta forma podemos ver, que o IFN- $\gamma$  se consolida como um dos principais pilares da inflamação, redução de peso e mortalidade. Ao submeter os animais com o tratamento utilizando EGS, pudemos modular de forma negativa esta citocina, o que resultou na redução de morbidade dos animais tratados.

Durante a nossa análise de citocinas, observamos baixos índices de detecção para a maioria das citocinas analisadas. A hipótese por trás disso é o momento da infecção, visto que os animais no momento da eutanásia estavam melhores e tinham menos sinais clínicos. Outra hipótese por trás dessa situação é que ao diluirmos as amostras 5x fizemos que algumas citocinas não puderam ser detectadas pelo ensaio utilizado. Desta forma, novos ensaios serão realizados utilizando amostras não diluídas.

Portanto, nosso trabalho se mostrou essencial ao mostrar um modelo de estudos para pesquisa de novos imunobiológicos. Vimos por meio dos nossos resultados que a saliva possui um ótimo efeito imunomodulador, reduzindo os sinais clínicos, diminuindo efeitos deletérios da inflamação exacerbada e modulando a produção de IL-10 intestinal nos animais tratados com EGS. Visto que as respostas imunes são essenciais para a sobrevivência dos organismos, a imunomodulação deve ser vista com cuidado, pois ao se diminuir o processo inflamatório podemos interferir no processo de proliferação dos parasitas. À vista disso, novos estudos são necessários para elucidar melhor a repostas imunológicas e os efeitos do tratamento com o EGS sobre os parasitas. Dado às inúmeras dificuldades para o tratamento da doença de Crohn e de outras doenças autoimunes, é de suma importância o tratamento e a pesquisa para buscar novos imunomodulares mais eficientes que os atuais.

Nosso trabalho se consolida importante também por analisar a relação a relação parasito-hospedeiro no microambiente intestinal. Vimos que os grupos tratados com EGS obtiveram menores quantidades de cistos de parasita no cérebro. Desta forma, podemos observar que a modulação da resposta imune se consolida como um fator importante para o controle da infecção, interferindo na biologia do parasita e no desenvolvimento da doença. É observado que animais BALB/C ao serem infectados por *T. gondii* desenvolvem uma resposta imune adequada não exacerbada, possuindo resistência a infecção. Já os camundongos C57BL/6 são suscetíveis ao *T. gondii*, desenvolvendo uma resposta imune exacerbada com altos índices de infecção. Portanto, observamos a importância da resposta imune balanceada no controle da doença. No nosso estudo podemos ver claramente a diferença de níveis inflamação e parasitismo nos grupos experimentais, enaltecendo ainda mais a importância do processo inflamatório balanceado na relação parasito-hospedeiro no microambiente intestinal. Devido os inúmeros danos que a toxoplasmose promove para a saúde e para o setor pecuário, é importante o conhecimento da relação parasito-hospedeiro, para futuramente buscar soluções práticas, mitigando os danos causados pela parasita.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que a saliva de *R. prolixus* apresenta capacidade imunomoduladora capaz de reduzir as complicações causadas por um processo inflamatório acentuado. O tratamento com EGS mostrou-se eficiente ao diminuir nos grupos tratados, os escores de morbidade e a perda de peso e ao aumentar a porcentagem de sobrevivência. Desta forma, o tratamento com EGS se mostrou um imunobiológico promissor para o tratamento de uma inflamação intestinal exacerbada. Além disso, o tratamento foi capaz de reduzir o número de cistos de *T. gondii* no tecido cerebral. Estes achados podem estar associados com a diminuição da resposta imune capaz de promover o encistamento de *T. gondii* ou com a redução da inflamação no intestino e consequente preservação da integridade da barreira.

- O tratamento com 30µg de EGS foi capaz de reduzir os escores de morbidade causados pela infecção por *T. gondii*;
- O tratamento com 30µg de EGS mostrou-se eficiente reduzindo a perda de peso provocada pela infecção por *T. gondii*;
- O tratamento com EGS na maior concentração não alterou de forma significativa o tamanho do intestino delgado dos animais infectados por *T. gondii*;
- O tratamento com EGS, independente da concentração, promoveu redução no número de cistos no tecido cerebral de camundongos infectados por *T. gondii*;
- O tratamento com EGS com a maior concentração de EGS promoveu maior percentual de sobrevivência em animais infectados por *T. gondii*.
- O tratamento com 30µg de EGS foi capaz de aumentar significativamente a produção de IL-10 no intestino.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGBOLA, S. O. et al. Anti-TNF therapy in Crohn's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018.

ADEN, K. et al. Epithelial IL-23R Signaling Licenses Protective IL-22 Responses in Intestinal Inflammation. **Cell reports**, v. 16, n. 8, p. 2208–2218, 2016.

ANANTHAKRISHNAN, A. N. et al. A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Gastroenterology**, 2013a.

ANANTHAKRISHNAN, A. N. et al. Sleep disturbance and risk of active disease in patients with crohn's disease and ulcerative colitis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, 2013b.

ANANTHAKRISHNAN, A. N. et al. Association Between Depressive Symptoms and Incidence of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: Results From the Nurses' Health Study. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, 2013c.

ANDERSSON, R. E. et al. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. **Gastroenterology**, 2003.

BARBOSA, B. F. et al. Susceptibility to Vertical Transmission of *Toxoplasma gondii* is Temporally Dependent on the Preconceptional Infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, 2007.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends in microbiology**, 2003.

BARTLEY, P. M. et al. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo. **Parasitology**, 2006.

BASSO, P. J. et al. Association among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2014.

BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Gastroenterology 2 Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **Gastroenterology**, 2007.

BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. **Crohn's disease**. The Lancet. **Anais...**2012

BEKIARIS, V.; PERSSON, E. K.; AGACE, W. W. Intestinal dendritic cells in the regulation of mucosal immunity. **Immunological Reviews**, 2014.

BENEVIDES, L. et al. CCR2 receptor is essential to activate microbicidal mechanisms to control *Toxoplasma gondii* infection in the central nervous system. **American Journal of Pathology**, 2008.

BENSON, A. et al. Gut Commensal Bacteria Direct a Protective Immune Response against *Toxoplasma gondii*. **Cell Host and Microbe**, 2009.

BIEDERMANN, L. et al. Smoking cessation alters intestinal microbiota: Insights from quantitative investigations on human fecal samples using FISH. **Inflammatory Bowel Diseases**, 2014.

BIRCHENOUGH, G. M. H. et al. New developments in goblet cell mucus secretion and function. **Mucosal Immunology**, 2015.

BOGITSH, B. B.; CARTER, C. E.; OELTMANN, T. T. **Human Parasitology**. [s.l: s.n.].

BOUSKRA, D. et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. **Nature**, 2008.

BOUT, D. et al. Interaction between *Toxoplasma gondii* and enterocyte. **Immunobiology**, 1999

CANI, P. D. Human gut microbiome: Hopes, threats and promises. **Gut**, 2018.

CEREIJIDO, M. et al. New Diseases Derived or Associated with the Tight Junction. **Archives of Medical Research**, 2007.

CHAPMAN-KIDDELL, C. A. et al. Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, 2010.

- CHELAKKOT, C.; GHIM, J.; RYU, S. H. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. **Experimental and Molecular Medicine**, 2018.
- CHEROUTRE, H.; LAMBOLEZ, F.; MUCIDA, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, 2011.
- CLEMENTE, J. C. et al. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. **Cell**, 2012.
- COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. The gut mucosal immune response to *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, 2015.
- COLOMBEL, J. F. et al. Adalimumab for Maintenance of Clinical Response and Remission in Patients With Crohn's Disease: The CHARM Trial. **Gastroenterology**, 2007.
- CORR, S. C.; GAHAN, C. C. G. M.; HILL, C. M-cells: Origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 2008.
- COTE-SIERRA, J. et al. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2004.
- COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. **The Journal of Immunology**, 2008.
- COUTURIER-MAILLARD, A. et al. Interleukin-22-deficiency and microbiota contribute to the exacerbation of *Toxoplasma gondii*-induced intestinal inflammation article. **Mucosal Immunology**, 2018.
- DARFEUILLE-MICHAUD, A. et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. **Gastroenterology**, 2004.
- DE MATTOS, B. R. R. et al. Inflammatory bowel disease: An overview of immune mechanisms and biological treatments. **Mediators of Inflammation**, 2015.



- DEVKOTA, S. et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10<sup>-/-</sup> mice. **Nature**, 2012.
- DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, 1998
- EBERT, D. Host-parasite coevolution: Insights from the Daphnia-parasite model system. **Current Opinion in Microbiology**, 2008.
- EGAN, C. E. et al. CCR2-dependent intraepithelial lymphocytes mediate inflammatory gut pathology during *Toxoplasma gondii* infection. **Mucosal Immunology**, 2009.
- EGAN, C. E.; COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. **Immunology and Cell Biology**, 2012.
- EGAN, C. E.; COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. NIH Public Access. v. 90, n. 7, p. 668–675, 2014.
- ERI, R.; CHIEPPA, M. Messages from the inside. The dynamic environment that favors intestinal homeostasis. **Frontiers in Immunology**, 2013.
- GAJENDRAN, M. et al. A comprehensive review and update on Crohn's disease. **Disease-a-Month**, 2018.
- GALVEZ, J.; RODRÍGUEZ-CABEZAS, M. E.; ZARZUELO, A. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. **Molecular Nutrition and Food Research**, 2005.
- GHOSH, S. Regular review: Ulcerative colitis. **Bmj**, v. 320, n. 7242, p. 1119–1123, 2000.
- GHOSH, S. S. et al. Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. **Journal of the Endocrine Society**, 2020.
- GILLESPIE, R. D. et al. Identification of an IL-2 Binding Protein in the Saliva of the Lyme Disease Vector Tick, *Ixodes scapularis*. **The Journal of Immunology**, 2001.
- GREGG, B. et al. Replication and distribution of *Toxoplasma gondii* in the small intestine after oral infection with tissue cysts. **Infection and Immunity**, 2013.

GROSCHWITZ, K. R.; HOGAN, S. P. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2009.

GÜNZEL, D.; YU, A. S. L. Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. **Physiological Reviews**, 2013.

HANAUER, S. B. Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflammatory Bowel Diseases**, 2006.

HANS, W. et al. The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 2000.

HEIMESAAT, M. M. et al. Gram-Negative Bacteria Aggravate Murine Small Intestinal Th1-Type Immunopathology following Oral Infection with *Toxoplasma gondii* . **The Journal of Immunology**, 2006.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**, 2005.

HUTCHISON, W. M. et al. Life Cycle of *Toxoplasma gondii*. **British Medical Journal**, 1969.

ITO, R. et al. Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. **Clinical and Experimental Immunology**, 2006.

JONES, J. L. et al. Congenital toxoplasmosis: A review. **Obstetrical and Gynecological Survey**, 2001.

JU, C.-H.; CHOCKALINGAM, A.; LEIFER, C. A. Early Response of Mucosal Epithelial Cells during *Toxoplasma gondii* Infection. **The Journal of Immunology**, 2009.

KAGNOFF, M. F. The intestinal epithelium is an integral component of a communications network. **Journal of Clinical Investigation**, 2014.

KAPLAN, G. G. The global burden of IBD: From 2015 to 2025. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, 2015.

KHAN, I. A. et al. A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1997.

KIELA, P. R.; GHISHAN, F. K. Physiology of intestinal absorption and secretion. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, 2016.

KO, J. K.; AUYEUNG, K. K. Inflammatory bowel disease: etiology, pathogenesis and current therapy. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 7, p. 1082–96, 2014.

KOCHANOWSKY, J. A.; KOSHY, A. A. *Toxoplasma gondii*. **Current Biology**, 2018.

KUHN, K. A.; STAPPENBECK, T. S. Peripheral education of the immune system by the colonic microbiota. **Seminars in Immunology**, 2013.

KUNISAWA, J.; TAKAHASHI, I.; KIYONO, H. Intraepithelial lymphocytes: Their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. **Immunological Reviews**, 2007.

LEE, S. Y. et al. Metformin ameliorates inflammatory bowel disease by suppression of the stat3 signaling pathway and regulation of the between Th17/Treg Balance. **PLoS ONE**, 2015.

LEE, Y. K.; MAZMANIAN, S. K. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system?. **Science**, 2010.

LEITNER, W. W.; DENIS, A. C. SAINT; WALI, T. Immunological consequences of arthropod vector-derived salivary factors. **European Journal of Immunology**, 2011.

LIESENFELD, O. et al. Association of CD4+ T cell-dependent, interferon- $\gamma$ -mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Experimental Medicine**, 1996.

- LIESENFELD, O. et al. TNF- $\alpha$ , nitric oxide and IFN- $\gamma$  are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, 1999.
- LIESENFELD, O. Oral Infection of C57BL/6 Mice with *Toxoplasma gondii*: A New Model of Inflammatory Bowel Disease? . **The Journal of Infectious Diseases**, 2002.
- LOCEY, K. J.; LENNON, J. T. Scaling laws predict global microbial diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2016.
- LOUIS, P.; HOLD, G. L.; FLINT, H. J. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. **Nature Reviews Microbiology**, 2014.
- MACPHERSON, A. J.; GEUKING, M. B.; MCCOY, K. D. Immunoglobulin A: A bridge between innate and adaptive immunity. **Current Opinion in Gastroenterology**, 2011.
- MAMMARI, N. et al. *Toxoplasma gondii* Modulates the Host Cell Responses: An Overview of Apoptosis Pathways. **BioMed Research International**, 2019.
- MATSUOKA, K.; KANAI, T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. **Seminars in Immunopathology**, 2015.
- MCCONNAUGHEY, M. **Life Cycle of Parasites**☆. [s.l.] Elsevier Inc., 2014.
- MCGILLIGAN, V. E. et al. Hypothesis about mechanisms through which nicotine might exert its effect on the interdependence of inflammation and gut barrier function in ulcerative colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, 2007.
- MENDES, M. T. et al. Effect of the saliva from different triatomine species on the biology and immunity of TLR-4 ligand and *Trypanosoma cruzi*-stimulated dendritic cells. **Parasites and Vectors**, 2016.
- MIRON, N.; CRISTEA, V. Enterocytes: Active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. **Clinical and Experimental Immunology**, 2012.

- MOHAMMADI, R. et al. The relationship between intestinal parasites and some immune-mediated intestinal conditions. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, 2015.
- MOLODECKY, N. A. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, 2012.
- MONACO, C. et al. Anti-TNF therapy: Past, present and future. **International Immunology**, 2015.
- MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological Reviews**, 2011.
- O'NEILL, L. A. J.; GOLENBOCK, D.; BOWIE, A. G. The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, 2013.
- OKAMOTO, R.; WATANABE, M. Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. **Journal of Gastroenterology**, 2004.
- PALMELA, C. et al. Adherent-invasive Escherichia coli in inflammatory bowel disease. **Gut**, 2018.
- PETERSON, D. A. et al. IgA Response to Symbiotic Bacteria as a Mediator of Gut Homeostasis. **Cell Host and Microbe**, 2007.
- PITHADIA, A. B.; JAIN, S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). **Pharmacological Reports**, 2011.
- PIZARRO, T. T. et al. Mouse models for the study of Crohn's disease. **Trends in Molecular Medicine**, 2003.
- RADKE, J. R.; WHITE, M. W. A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 1998.

- RESCIGNO, M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. **Trends in Immunology**, 2011.
- ROBERTS, C. L. et al. Translocation of Crohn's disease *Escherichia coli* across M-cells: Contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers. **Gut**, 2010.
- ROOKS, M. G.; GARRETT, W. S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. **Nature Reviews Immunology**, 2016.
- SAADATNIA, G.; GOLKAR, M. A review on human toxoplasmosis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, 2012.
- SAENZ, S. A.; TAYLOR, B. C.; ARTIS, D. Welcome to the neighborhood: Epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. **Immunological Reviews**, 2008.
- SAIRENJI, T.; COLLINS, K. L.; EVANS, D. V. An Update on Inflammatory Bowel Disease. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, 2017.
- SALES-CAMPOS, H. et al. Salivary Gland Extract of Kissing Bug, *Triatoma lecticularia*, Reduces the Severity of Intestinal Inflammation through the Modulation of the Local IL-6/IL-10 Axis. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, 2018.
- SANOS, S. L.; DIEFENBACH, A. Innate lymphoid cells: From border protection to the initiation of inflammatory diseases. **Immunology and Cell Biology**, 2013.
- SARTOR, R. B. Mechanisms of disease: Pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 7, p. 390–407, 2006.
- SARTOR, R. B. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**, 2008.
- SCHAEFER, C. W.; PANIZZI, A. R. **Heteroptera of economic importance**. [s.l.: s.n.].

SCHARTON-KERSTEN, T. M. et al. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 1996.

SCHOELER, G. B.; WIKEL, S. K. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 2001.

SELLON, R. K. et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. **Infection and Immunity**, 1998.

SHACHAR, I.; KARIN, N. The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. **Journal of Leukocyte Biology**, 2013.

SHANAHAN, F. **Crohn's disease**. *Lancet*. 2002

SHAO, L.; SERRANO, D.; MAYER, L. The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. **Seminars in Immunology**, v. 13, n. 3, p. 163–175, 2001.

SHER, A. et al. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 1993.

SONNENBERG, A. Occupational distribution of inflammatory bowel disease among German employees. **Gut**, 1990.

SPECIAN, R. D.; OLIVER, M. G. Functional biology of intestinal goblet cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 2017.

STEVENS, L. et al. Kissing Bugs. The Vectors of Chagas. In: **Advances in Parasitology**. [s.l: s.n.].

SUTHERLAND, G. B.; EWEN, A. B. Fecundity decrease in mosquitoes ingesting blood from specifically sensitized mammals. **Journal of Insect Physiology**, 1974.

SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2013.

SUZUKI, Y. et al. IL-10 Is Required for Prevention of Necrosis in the Small Intestine and Mortality in Both Genetically Resistant BALB/c and Susceptible C57BL/6 Mice Following Peroral Infection with *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, 2000.

SUZUKI, Y. et al. Removal of *Toxoplasma gondii* cysts from the brain by perforin-mediated activity of CD8+ T cells. **American Journal of Pathology**, 2010.

TAIT, E. D.; HUNTER, C. A. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2009.

TERRAZAS, C. A. et al. *Toxoplasma gondii*: Impaired maturation and pro-inflammatory response of dendritic cells in MIF-deficient mice favors susceptibility to infection. **Experimental Parasitology**, 2010.

THIA, K. T. et al. Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. **Gastroenterology**, v. 139, n. 4, p. 1147–1155, 2010.

TITUS, R. G.; BISHOP, J. V.; MEJIA, J. S. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. **Parasite Immunology**, 2006.

TURNBAUGH, P. J. et al. The Human Microbiome Project. **Nature**, 2007.

TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, 2009.

VANCAMELBEKE, M.; VERMEIRE, S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. **Expert Review of Gastroenterology and Hepatology**, 2017.

VANDENABEELE, P. et al. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. **Trends in Cell Biology**, 1995.



WIKEL, S. K. Modulation of the host immune system by ectoparasitic arthropods: Blood-feeding and tissue-dwelling arthropods manipulate host defenses to their advantage.

**BioScience**, 1999.

WILLIAMS, J. M. et al. Epithelial Cell Shedding and Barrier Function: A Matter of Life and Death at the Small Intestinal Villus Tip. **Veterinary Pathology**, 2015.

XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease **Nature**, 2007.

YAROVINSKY, F. Toll-like receptors and their role in host resistance to *Toxoplasma gondii*.

**Immunology Letters**, 2008.

YOUNGBLUT, N. D. et al. Host diet and evolutionary history explain different aspects of gut microbiome diversity among vertebrate clades. **Nature Communications**, 2019.

## ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –




## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação do papel imunomodulador da saliva de *Rhodnius prolixus* na infecção intestinal por *Toxoplasma gondii*”, protocolo nº 023/19, sob a responsabilidade de **Bellisa de Freitas Barbosa** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **28 de Junho de 2019**.

(We certify that the project entitled “Avaliação do papel imunomodulador da saliva de *Rhodnius prolixus* na infecção intestinal por *Toxoplasma gondii*”, protocol 023/19, under the responsibility of **Bellisa de Freitas Barbosa** - Involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of June 28th, 2019).

Vigência do Projeto	Início: 30/07/2019 Término: 30/12/2021
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo Isogênico C57BL/6/ Roedor <i>Calomys callosus</i>
Número de animais	74
Peso / Idade	20g/ 08 - 10 semanas – 70 machos 40g/ 05 – 10 meses – 04 machos
Sexo	Macho
Origem / Local	Rede de Biotérios de Roedores da UFU – REBIR-UFU
Local onde serão mantidos os animais:	Rede de Biotérios de Roedores da UFU – REBIR-UFU

Uberlândia, 01 de Julho de 2019.

  
**Prof. Dr. Lucio Vilela Carneiro Girão**  
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
 Comissão de Ética na Utilização de Animais /UFU  
 Coordenador da CEUA  
 Portaria Nº 542 DE 10 DE MAIO DE 2019