

RESVERATROL ASSOCIADO À SULFADIAZINA EM LINFÓCITOS INFECTADOS COM *TOXOPLASMA GONDII*

MANUELA CAZAUBON SOARES MARTINEZ¹; ROSANE MARIA BIANCHIN²;
MARIA ROSA CHITOLINA³; NATHIELI BIANCHIN BOTTARI⁴

¹Departamento de Microbiologia e Parasitologia; Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil, – manuelacazaubonmartinez@gmail.com

²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brasil - rosanebottari@gmail.com.

³Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brasil. – mariachitolina@gmail.com.

⁴Departamento de Microbiologia e Parasitologia; Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil. (Pelotas). – nathieli_bb@hotmail.com.

1. INTRODUÇÃO

Na última década, vários estudos têm destacado os mecanismos de evasão imune pelo *Toxoplasma gondii* (Lang et al., 2007; Lima e Lodoen et al., 2019). Este protozoário invade quase todas as células nucleadas e utiliza diferentes estratégias para manipular com sucesso o sistema imune do hospedeiro, estabelecendo uma infecção latente de longo prazo (Innes, 2010). Durante esses processos, *T. gondii* regula as células hospedeiras modulando aspectos morfológicos, fisiológicos, imunológicos, genéticos e biológicos (Dubey, 2010; Brasil et al., 2017).

Após a infecção, as células do hospedeiro são moduladas para manter um delicado equilíbrio entre facilitar e eliminar a infecção (Sasai et al., 2018). Uma parte chave deste equilíbrio envolve o reconhecimento de *T. gondii* por células do sistema imune inato e adaptativo, como os linfócitos, o principal tipo celular que controla o parasita na resposta imune adaptativa dos mamíferos (Gigley et al., 2009; Tsitsiklis et al., 2019). Contudo, a extensão de estudos acerca do *T. gondii* em células humanas (linfócitos) ainda não é totalmente compreendida.

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa têm investigado o efeito do resveratrol (RSV), um polifenol natural encontrado em uvas, como um candidato para o tratamento da toxoplasmose (Bottari et al., 2015, 2019). O RSV demonstrou efeitos benéficos contra o *T. gondii* e também modulou a sinalização celular e imune em camundongos infectados com *T. gondii* e tratados com RSV. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi elucidar os efeitos do RSV em linfócitos experimentalmente infectados com *T. gondii*.

2. METODOLOGIA

Para este estudo, foi utilizado uma linhagem virulenta RH tipo I de *Toxoplasma gondii*. As células foram cultivadas em meio RPMI (Gibco, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) a 37°C em 5% de CO₂. Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas de amostras de sangue venoso periférico de voluntários saudáveis, conforme aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Maria (CAAE:13192719.0.0000.5346). As células polimorfonucleares

(PMNs) foram isoladas por separação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque. A pureza celular foi determinada por coloração diferencial com Giemsa, e a viabilidade das células foi avaliada pelo reagente azul de tripâo. As PMNs foram semeadas para manutenção em cultura na densidade de 1×10^5 células/cm² e incubadas por 24 horas a 37°C, em 5% de CO₂, em meio com parasita e tratamentos. O resveratrol foi diluído em DMSO (0,1%) e adicionado ao meio de cultivo em concentrações finais de 1 a 75 µM. O RSV foi incubado com as células por um período de 24 horas. Sulfadiazina-trimetoprima (Bactrim®) foi dissolvida em DMSO a 0,1% e meio RPMI (Invitrogen-Gibco) na concentração final de 25 µg/mL, conforme metodologia descrita por Sanfelic *et al.* (2021). Imagens dos linfócitos viáveis sob condições controle e após adição de RSV ou sulfadiazina foram registradas após 24 horas usando um microscópio invertido (Nikon) acoplado a uma câmera digital. As imagens foram processadas com o software NIS-Elements 2.3 v para medir áreas e distâncias entre células. Foram tiradas cinco imagens por condição experimental. Os efeitos do RSV na viabilidade dos linfócitos infectados por *T. gondii* foram avaliados com base na oxidação mitocondrial usando o ensaio colorimétrico MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio brometo) (Mosmann, 1983). Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço/200 µl) em intervalos de 24 horas após exposição a *T. gondii* e/ou RSV. Células controle e tratadas foram incubadas com MTT a concentração final de 1 mg/mL por 3 horas. A densidade óptica de cada amostra foi medida a 570 nm usando um leitor de microplacas espectrofotométrico. Os dados estão apresentados como porcentagem de células viáveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados revelam que a viabilidade celular de PMNs foi menor nas células infectadas por *T. gondii* após 24 horas, quando comparada às não infectadas (grupo controle) ($p<0.05$). O tratamento com SFD isolado reduziu a viabilidade celular tanto em células infectadas quanto não infectadas 24 horas após incubação, em comparação ao controle negativo. O tratamento com RSV isolado nas diferentes concentrações (1 à 75µM) não aumentou a atividade mitocondrial dos linfócitos após 24 horas em comparação ao controle negativo. Quando PMNs foram infectados com *T. gondii* e tratados com SFD observou-se uma redução significativa da viabilidade celular quando comparado ao controle positivo (grupo infectado). Além disso, em células infectadas por *T. gondii*, e tratadas com RSV nas concentrações de 1 a 50 µM aumentaram a porcentagem de linfócitos viáveis, após 24 de incubação, em comparação ao controle positivo (grupo infectado) ($p<0,001$).

Abordagens terapêuticas *in vitro* com foco em estimulação imunológica têm sido investigadas no contexto da toxoplasmose (Lima e Lodoen, 2019). Nossos dados revelam o RSV como um candidato terapêutico promissor já que não alterou a viabilidade de PMNs. Além disso, dado aos efeitos antioxidantes e antiinflamatórios (Meng *et al.*, 2020) conhecidos do RSV, quando utilizado em células infectadas com *T. gondii*, o RSV modulou positivamente a atividade mitocondrial de PMNs ativando as células e modulando positivamente a resposta inflamatória conforme estudos preliminares (Bottari *et al.*, 2015, 2019). A

associação de RSV a SFD, opção de tratamento comercialmente disponível atualmente, também parecem estimular linfócitos infectados por *T. gondii*.

4. CONCLUSÕES

Portanto, nossos dados demonstram que o RSV modula positivamente a viabilidade dos linfócitos durante a infecção por *T. gondii*. Além disso, o RSV, devido aos seus efeitos biológicos antioxidantes e anti-inflamatórios, combinado a SFD, sugerem ser uma alternativa terapêutica segura como alvo para o tratamento da toxoplasmose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LANG, C.; GROB, U.; LÜDER, C.G.K. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research*, Heidelberg, v.100, p.191-203, 2007.
- LIMA, T.S.; LODOEN, M.B. Mechanisms of human innate immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Lausanne, v.9, p.103, 2019.
- INNES, E.A. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses and Public Health*, Berlin, v.57, n.1, p.1-7, 2010.
- BRASIL, T.R.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; MORROT, A. et al. Host-*Toxoplasma gondii* coadaptation leads to fine tuning of the immune response. *Frontiers in Immunology*, Lausanne, v.8, p.1080, 2017.
- DUBEY, J.P. *Toxoplasmosis of animals and humans*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.
- SASAI, M.; PRADIPTA, A.; YAMAMOTO, M. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. *International Immunology*, Oxford, v.30, n.3, p.113-119, 2018.
- TSITSIKLIS, A.; BANGS, D.J.; ROBEY, E.A. CD8+ T cell responses to *Toxoplasma gondii*: lessons from a successful parasite. *Trends in Parasitology*, London, 2019.
- GIGLEY, J.P.; FOX, B.A.; BZIK, D.J. Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii* develops primarily by local Th1 host immune responses in the absence of parasite replication. *The Journal of Immunology*, Baltimore, v.182, n.2, p.1069-1078, 2009.
- BOTTARI, N.B.; PILLAT, M.M.; SCHETINGER, M.R. et al. Resveratrol-mediated reversal of changes in purinergic signaling and immune response induced by *Toxoplasma gondii* infection of neural progenitor cells. *Purinergic Signalling*, Basel, v.15, p.77-84, 2019.
- BOTTARI, N.B.; BALDISSERA, M.D.; TONIN, A.A. et al. Effects of sulfamethoxazole-trimethoprim associated to resveratrol on its free form and complexed with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin on cytokines levels of mice

infected by *Toxoplasma gondii*. *Microbial Pathogenesis*, Amsterdam, v.87, p.40-44, 2015.

SANFELIC, R.A.S.; BORTOLETI, B.T.S.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Biogenic silver nanoparticles (AgNp-Bio) reduce *Toxoplasma gondii* infection and proliferation in HeLa cells, and induce autophagy and death of tachyzoites by apoptosis-like mechanism. *Acta Tropica*, Amsterdam, v.222, p.106070, 2021.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, Amsterdam, v.65, p.55-63, 1983.

MENG, X.; ZHOU, J.; ZHAO, C.N. et al. Health benefits and molecular mechanisms of resveratrol: a narrative review. *Foods*, Basel, v.9, n.3, p.340, 2020.