

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E**  
**BIOAGENTES PATOGÊNICOS**

**Igor Emiliano Lemos de Souza**

**Toxicidade das proteínas MIC1 e MIC4 de *Toxoplasma gondii* sobre linhagens de células T humanas**

**Ribeirão Preto**

**2023**

**Igor Emiliano Lemos de Souza**

**Toxicidade das proteínas MIC1 e MIC4 de *Toxoplasma gondii* sobre linhagens de células T humanas**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira

Co-orientador: Prof. Dr. Ademilson Panunto Castelo

**Ribeirão Preto**

**2023**

## FICHA Catalográfica

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica

Souza, Igor Emiliano Lemos de

Toxicidade das proteínas MIC1 e MIC4 de *Toxoplasma gondii* sobre linhagens de células T humanas, Ribeirão Preto, 2023

115p.: Il.; 30cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração Biologia Celular e Molecular. Orientadora: Roque Antunes Barreira, Maria Cristina

1-*Toxoplasma gondii*. 2- Micronema. 3-Apoptose. 4-Lectina.

## FOLHA de AVALIAÇÃO

**Nome: Igor Emiliano Lemos de Souza**

**Título: Toxicidade das proteínas MIC1 e MIC4 de *Toxoplasma gondii* sobre linhagens de células T humanas**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Apoio Financeiro: Fundação de Amparo de à Pesquisa do Estado de São Paulo-Fapesp. Processo de n° 2019/07411-2.

# **Agradecimientos**

Aos meus pais, Geraldo e Bernadete, que sempre me apoiaram integralmente nas minhas buscas profissionais para que eu obtivesse sucesso

À Professora Dra. Maria Cristina Roque Barreira, pela confiança depositada em meu trabalho e por garantir sempre as melhores condições para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Professor Dr. Ademilson Panunto Castelo, pelo respeito, paciência e pela confiança depositada em mim por todos esses anos. Agradeço ainda pelas lições de ensinamentos, dedicação e por todo apoio que sempre me atendeu.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação e para a realização desse trabalho, muito obrigado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido no início da realização desse trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido durante os quase quatro anos de realização desse trabalho (processo número 2019/07411-2).

## Resumo

Souza, Igor Emiliano Lemos de. **Toxicidade das proteínas MIC1 e MIC4 de *Toxoplasma gondii* sobre linhagens de células T humanas.** 2023. 115 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

*Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório causador da toxoplasmose, uma zoonose cosmopolita que tem alta incidência no mundo todo. A doença pode variar de branda ou assintomática em indivíduos imunocompetentes à doença grave em pacientes imunodeficientes ou fetos de mães com toxoplasmose aguda. Uma das características mais interessantes do *T. gondii* consiste na sua capacidade de infectar possivelmente todas as células nucleadas de hospedeiros homeotérmicos. Esse processo de invasão é um processo mediado por uma série de moléculas, incluindo aquelas secretadas por organelas especializadas - roptrias, micronemas e grânulos densos. Tais proteínas auxiliam na interação entre protozoário e célula hospedeira, criação e manutenção do vacúolo parasitóforo e egresso do parasito da célula infectada. Nosso grupo tem estudado duas lectinas secretadas pelas micronemas, MIC1 e MIC4, as quais formam um complexo com a proteína MIC6. Quando o complexo MIC1/MIC4/MIC6 é exposto na membrana plasmática do parasito, as proteínas MIC1 e MIC4 reconhecem receptores glicosilados na célula hospedeira, isso permite uma interação mais forte entre o parasito a célula hospedeira. A escassez de estudos envolvendo a interação entre *T. gondii* e linfócitos humanos nos fez avaliar o efeito das proteínas recombinantes MIC1 e MIC4 em células linhagem de linfócito T humano Jurkat. Observou-se que essas MICs interagem melhor com células Jurkat a 37°C, sendo essa ligação dependente de seus domínios de reconhecimento de carboidrato. Diversas lectinas tem se mostrado citotóxicas para células de linhagem. Dessa maneira, estimulou-se as células Jurkat com diferentes concentrações de MIC1r ou MIC4r, obtendo-se perda de viabilidade dessas células. Com o uso de marcação com anexin V e iodeto de propídeo e avaliação da clivagem de cromatina, determinou-se que MIC1r e MIC4r causavam apoptose em células Jurkat. Vale ressaltar que MIC1r e MIC4r aumentam a marcação de caspase 3/7/8, sendo que os efeitos citotóxicos desencadeados por essas MICs são revertidos após a incubação com o inibidor pan-caspase Emricasan. A estimulação de células Jurkat com MIC1r ou MIC4r também induziu uma redução do potencial mitocondrial. Em conjunto estes dados sugerem que MIC1r e MIC4r estimulam a morte celular pela ativação da via extrínseca e intrínseca do apoptose. Outros dados adicionais mostraram que as vias utilizadas por essas MICs para causar morte celular em células Jurkat dependem de MAPK JNK e p38, moléculas sinalizadoras intracelulares envolvidas na resposta celular ao estresse. De fato, MIC1r e MIC4r induzem sinalização de estresse às células, o que pode ser observado pela liberação de ROS por meio do complexo NADPH oxidase. Corroborando esses dados, descobriu-se que o agente redutor NAC reduz consideravelmente a marcação de caspase3/7 e iodeto de propídeo nos grupos estimulados com MIC1 ou MIC4. Em conjunto, nossos dados indicam que as proteínas de micronema interagem com receptores presentes nas células linfocíticas humanas de maneira dependente do reconhecimento de carboidratos e causam morte celular na dependência da liberação de ROS e ativação de MAPK.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, Micronema, Apoptose, Lectina.



## Abstract

Souza, Igor Emiliano Lemos de. **Toxicity of *Toxoplasma gondii* proteins MIC1 and MIC4 on human T cell lines.** 2023. 115 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite that causes toxoplasmosis, a cosmopolitan zoonosis that has a high incidence worldwide. The disease can range from mild or asymptomatic in immunocompetent individuals to severe disease in immunodeficient patients or fetuses of mothers with acute toxoplasmosis. One of the most interesting characteristics of *T. gondii* is its ability to possibly infect all nucleated cells of homeothermic hosts. This invasion process is mediated by a series of molecules, including those secreted by specialized organelles - rhoptry, microneme, and dense granule. Such proteins help in the interaction between protozoan and host cells, the creation, and maintenance of the parasitophorous vacuole, and the egress of the parasite from the infected cell. Our group has studied two lectins secreted by micronemes, MIC1, and MIC4, which form a complex with the MIC6 protein. When the MIC1/MIC4/MIC6 complex is exposed on the parasite's plasma membrane, the MIC1 and MIC4 proteins recognize glycosylated receptors on the host cell, allowing a stronger interaction between the parasite and the host cell. The scarcity of studies involving the interaction between *T. gondii* and human lymphocytes led us to evaluate the effect of the recombinant proteins MIC1 and MIC4 on Jurkat human T lymphocyte cells. It was observed that these MICs interact better with Jurkat cells at 37°C, this binding being dependent on their carbohydrate recognition domains. Several lectins have been shown to be cytotoxic to lineage cells. Thus, Jurkat cells were stimulated with different concentrations of MIC1r or MIC4r, resulting in the loss of viability of these cells. Using annexin V and propidium iodide labeling and assessment of chromatin cleavage, rMIC1 and rMIC4 were determined to cause apoptosis in Jurkat cells. It is noteworthy that MIC1r and MIC4r increase caspases 3/7/8 labeling, and the cytotoxic effects triggered by these MICs are reversed after incubation with the pan-caspase inhibitor Emricasan. Stimulation of Jurkat cells with MIC1r or MIC4r also induced a reduction in mitochondrial potential. Taken together, these data suggest that MIC1r and MIC4r stimulate cell death by activating the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis. Additional data showed that the pathways used by these MICs to cause cell death in Jurkat cells depend on MAPK JNK and p38, intracellular signaling molecules involved in the cellular response to stress. In fact, MIC1r and MIC4r induce stress signaling to cells, which can be observed by the release of ROS through the NADPH oxidase complex. Corroborating these data, it was discovered that the reducing agent NAC considerably reduced the labelling of caspases 3/7 and propidium iodide in groups stimulated with MIC1 or MIC4. Taken together, our data indicate that microneme proteins interact with receptors present in human lymphocytic cells in a manner dependent on carbohydrate recognition and cause cell death dependent on ROS release and MAPK activation.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, Microneme, Apoptosis, Lectin.

## SUMÁRIO

1- Introdução .....	21
1.1 Toxoplasmose .....	22
1.2 Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	23
1.3 Micronemas e o complexo MIC1/MIC4/MIC6 .....	24
1.4 Lectina e morte celular .....	25
2- Objetivos.....	29
3- Materiais e métodos .....	31
4- Resultados.....	39
5- Discussão.....	60
6- Conclusão .....	67
7- Referências .....	69
8- Anexos .....	73

# Introdução

## 1. Introdução

### 1.1. Toxoplasmose

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório e agente causador da toxoplasmose, doença que ocorre que acomete humanos em todo o mundo (BLACK *et al.*, 2000). Infecção por esse protozoário é disseminada por todo o planeta embora sua prevalência ocorra de forma distinta de lugar para lugar. Nos estudos Unidos e Reino Unido é estimado que 16-40% estão infectados. Já na Europa continental e América Latina as estimativas variam de 50-80% (MONTROYA *et al.*, 2004). O parasito pertence ao filo Apicomplexa que possui outros gêneros como *Plasmodium*, *Cryptosporidium* e *Eimeria*. Historicamente, existem três linhagens definidas pelos números 1, 2 e 3 conforme a sua ocorrência na América do Norte e Europa (DARDÉ *et al.*, 2020). As linhagens são bem similares e variam de 1-2% nos nucleotídeos de seus genomas (BLACKWELL *et al.*, 2002). Entretanto, essas variações são responsáveis pelas diferentes patologias observadas em modelos murinos. O tipo I é letal em todas linhagens de camundongos, são mais móveis do que as cepas menos virulentas, e são mais capazes de migrar por barreiras fisiológicas. As linhagem II e III são menos patogênicas induzem maior resposta imunológica nos organismos hospedeiros o que possivelmente explica a rapidez com que essas cepas são mais rapidamente controladas (SAEIJ *et al.*, 2005).

A gravidade da toxoplasmose é dependente dos fatores relacionados do estado imunológico do paciente, perfil socioeconômico e faixa etária dos pacientes e a cepa que infectou o paciente. A maior parte de pessoas infectadas pelo *T. gondii* apresenta sintomas brandos ou inespecíficos que se assemelham ao resfriado. Entretanto, cerca de 10% dos pacientes imunocompetentes apresentam linfadenopatia cervical (MONTROYA *et al.*, 2004).

Enquanto diferenças sexuais não são completamente entendidas, mulheres adultas apresentam sintomas mais graves quando comparadas com homens da mesma faixa etária (GIEFING-KRÖLL *et al.*, 2015). Mulheres desenvolvem mais linfadenopatias do que homens e em pacientes com AIDS o desenvolvimento de encefalite é mais comumente observado em mulheres quando comparados com pacientes de sexo masculino (BEVERLEY *et al.*, 1976; PHILLIPS *et al.*, 1994). É interessante notar que em pacientes

infectados cronicamente não é observado nem um tipo de diferença (BERNIN *et al.*, 2014). Estas diferenças também são observadas em várias linhagens murinas onde isso é manifestado pela maior taxa de mortalidade, maior carga parasitaria e maiores áreas de lesões necróticas no intestino (ROBERTS *et al.*, 1995). Tratamento de fêmeas com testosterona reduzem as lesões intestinais e reduzem a carga parasitaria. Curiosamente, o tratamento de camundongos machos com estradiol não propiciou em alteração no quadro de infecção. Durante os estágios iniciais foi demonstrado que machos produzem mais TNF e IFN- $\gamma$  e exibem uma maior proliferação de células T quando comparado com fêmea indicando um atraso na resposta imunológica em camundongos fêmeas (WALKER *et al.*, 1997). Além disso, a infecção primária de mulheres grávidas pode ser um fator de risco ao feto devido a capacidade do parasito de cruzar a barreira placentária. Dentre os observados em crianças recém-nascidas se encontra calcificações cerebrais, retinocoroidite calcificações cerebrais hidrocefalia. Outros sintomas podem acompanhar como epilepsia, convulsões e retardo psicomotor e mental (MCAULEY, 2014).

#### 1.2. Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*

*T. gondii* possui três estágios infecciosos- o taquizoítos, é forma de dispersão dos parasitos, normalmente encontrado nos estágios iniciais de infecção ou durante a reativação de infecções latentes (DUBEY, 2020). O bradizoítos, normalmente ocorre na forma de cistos no interior das células é responsável pela forma crônica da toxoplasmose. E o esporozoítos forma expelida nas fezes de felinos e se encontra dentro do oocisto. Os humanos são considerados hospedeiros intermediários acidentais. Os felinos são os hospedeiros definitivos (HILL *et al.*, 2002). A infecção pelo *T. gondii* normalmente ocorre por meio da ingestão de alimentos contaminados com cistos contendo bradizoítos ou oocistos contendo esporozoítos. Outra forma de transmissão ocorre por meio de mães com infecção primária que transmitem o parasito para o feto (BLACK *et al.*, 2000). Outros tipos de transmissão menos comuns ocorrem por meio de transplantes de órgão infectados para pacientes imunossuprimidos (DEROUIN *et al.*, 2008).

Durante a infecção oral o parasito passa pelo trato gastrointestinal onde paredes dos cistos contendo o bradizoítos e esporozoítos são digeridos liberando parasitos livres no intestino (HILL *et al.*, 2002). Os parasitos livres infectam os enterócitos e posteriormente atingem a lamina própria. O parasito consegue ultrapassar a barreira epitelial por meio da invasão direta das células epiteliais, replicação ou por meio da

passagem parácrina entre as células epiteliais. Após a chegada dos parasitos na lamina própria os parasitas se multiplicam em diferentes tipos celulares como por exemplo, macrófago, monócitos, neutrófilos . O parasito rapidamente se espalha da lamina própria para outros tecidos sendo que os linfonodos secundários são os primeiros a serem infectados. Em modelos murinos as placas de Peyer e linfonodos mesentéricos são infectadas de dois a três dias após inoculação. Após uma semana o parasito é encontrado em órgãos distantes como pulmão, coração, fígado e cérebro. Durante a fase aguda, *T gondii* pode ser encontrado dentro de órgãos linfoides, sangue e baço de animais infectados demonstrando que a sua distribuição ocorre por meio da via linfática e hematogênica (HILL *et al.*, 2002).

O processo de invasão celular ocorre quando o parasito entra em contato com a célula hospedeira e normalmente ocorre de maneira rápida; por volta de 15 segundos o processo está completo. O processo inicial de interação entre célula hospedeira e parasito ocorre por meio do reconhecimento de proteínas na superfície celular com as proteínas SAG (do inglês- GPI-anchored surface antigen) do parasito (CARRUTHERS *et al.*, 2007). Após interação inicial o parasito posiciona a sua porção apical e libera o conteúdo da organela micronema o que causa uma interação mais forte entre célula hospedeira e parasita. A interação entre as proteínas de micronema e o citoesqueleto do parasito fornece a força necessária para invasão das células hospedeiras.

### 1.3. Micronemas e o complexo MIC1/MIC4/MIC6

Micronemas são organelas secretoras em forma de hastes, que liberam o seu conteúdo nas etapas iniciais de invasão do parasito a células hospedeiras (CARRUTHERS *et al.*, 1997b). Localizadas na parte anterior da célula do parasito, as micronemas possuem a função liberar proteínas essenciais que participam nos processos de adesão entre célula hospedeira e parasito, no movimento de *gliding* e durante o egresso do parasito da célula hospedeira (CARRUTHERS *et al.*, 2008). A maioria das proteínas de micronema contém estruturas modulares que são homólogos a domínios de adesão ou domínios ligantes presentes em eucariotos superiores como domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal (*EGF-like*), domínio semelhante ao de ligação a quitina (*chitin-like*) e o domínio repetido de trombospondina (LIU *et al.*, 2017). A variedades de domínios de adesão permitem ao protozoário a estabelecer ligação ou interação com

diferentes tipos celulares (ZHU *et al.*, 2021). Estudos recentes demonstraram que algumas proteínas de micronema desencadeiam sinalização na célula alvo indicando que estas proteínas possuem outras funções além da adesão entre célula hospedeira e parasito (MUNIZ-FELICIANO *et al.*, 2013; SARDINHA-SILVA *et al.*, 2019).

Dentre as proteínas estocadas nas micronemas se encontra o complexo formado pelas proteínas MIC1, MIC4 e MIC6 (DUBOIS *et al.*, 2019). MIC1 é uma proteína solúvel de aproximadamente 49kDa, foi a primeira proteína de micronema descrita (FOURMAUX *et al.*, 1996). Possui dois domínios repetidos micronemicos adesivos (do inglês MAR- *micronemal adhesive repeat*) com propriedade lectínicas na sua porção N-terminal. Estes domínios reconhecem receptores sialilados na superfície da célula hospedeira. MIC4 é proteína com peso molecular de aproximadamente 60kDa que possui 6 domínios *apple* repetidos que estão separados um do outro por apenas 3 aminoácidos (MARCHANT *et al.*, 2012). O quinto domínio *apple* de MIC4 é responsável por interagir com receptores das células hospedeiras por meio do reconhecimento de  $\beta$ 1-3 ou  $\beta$ 1-4 galactosamina presente em glicoproteínas expressas na superfície das células. MIC6 é uma proteína transmembrana de 34kDa que possui 3 domínios *EGF-like*. Possui a função de ancorar o complexo MIC1/MIC4/MIC6 na membrana do parasito (REISS *et al.*, 2001).

A interação entre as proteínas do complexo MIC1/MIC4/MIC6 ocorrem de modo não covalente. MIC1 interage por meio da interação entre os domínios MAR1 e MAR2 com os domínios *apple* 2 e 1, respectivamente, de MIC4 (ZHU *et al.*, 2021). A associação entre MIC1 e MIC6 ocorre entre o domínio semelhante a galectina com os domínios 2 e 3 semelhante a EGF (REISS *et al.*, 2001).

Estudos recente tem demonstrado que as MICs podem exercer outras funções além de ancorar a célula do parasito na superfície das células, como produção de citocinas e sinalização induzida na célula hospedeira contra autofagia (MUNIZ-FELICIANO *et al.*, 2013; SARDINHA-SILVA *et al.*, 2019).

#### 1.4. Lectinas e morte celular

Lectinas são proteínas que possuem pelo menos um sítio não catalítico capaz de reconhecer de forma reversível e específica mono- ou oligossacarídeo. A capacidade de ligação a carboidratos dessa classe de moléculas é atribuída a um segmento polipeptídico designado domínio de reconhecimento de carboidratos (TSANEVA *et al.*, 2020).

O primeiro estudo a demonstrar a capacidade de causar apoptose foi realizado por Griffiths e colaboradores em 1993. Neste trabalho, ficou demonstrado que células de tecidos linfoides intestinais se tornaram apoptóticas após administração de intramuscular de ricina em ratos (GRIFFITHS *et al.*, 1987). Posteriormente, dois trabalhos utilizando a lectina do visco e fitohemaglutinina mostraram o efeito citotóxicos em linfócitos T (BÜSSING *et al.*, 1996; WESSELBORG *et al.*, 1993). Estudos recentes demonstraram que além de apoptose as lectinas podem participar outros tipos de morte celular como autofagia, necroptose e paraptose (PARSHENKOV *et al.*, 2022).

Dados recentes demonstraram que as lectinas exercem a atividade citotóxica por meio da ativação da ligação de receptores de morte presentes na superfície das células, bloqueio da ligação de hormônios e ou fatores de crescimento em receptores, desestabilização de lisossomos ocasionando a liberação do seu conteúdo dessa no citoplasma, inibição da síntese proteica e produção de espécies reativas oxigênio (ROS) (FU *et al.*, 2011).

Milhares de células no nosso organismo morrem a cada segundo. Isso é importante para a adaptação a mudanças no ambiente e manutenção da homeostase (GREEN, 2022c). As células podem morrer em função de diferentes estímulos (NAGATA, 2018). Kerr e colaboradores descreveram em 1972 um tipo de morte celular onde as células se apresentavam com núcleo condensado e fragmentado (KERR *et al.*, 1972). Desde então vários estudos foram executados para desvendar os possíveis mecanismos desse tipo de morte celular. Sendo assim apoptose é um dos tipos de morte celular mais estudado.

A apoptose é um tipo de morte celular dependente de um grupo proteínas denominadas caspases (WONG, 2011). Esse nome deriva da característica enzimática dessas moléculas, qual seja são cisteíno-proteinases que geralmente clivam o substrato em um resíduo de aminoácido logo após um resíduo de aspartato (GREEN, 2022a). Existem duas classes de caspases: as iniciadoras e as executoras. As caspases iniciadoras são ativadas pela ligação de um determinado ligante a receptores expressos na superfície celular ou por meio da difusão de proteínas presentes no espaço intermembrana da mitocôndria (NAGATA, 2018). As caspases iniciadoras são necessárias pela ativação das caspases executoras e, estas vão clivar diferentes tipos de substratos no interior das células causando morfologia característica da apoptose (JULIEN *et al.*, 2017). De maneira geral existem dois mecanismos para ativação de caspases a via extrínseca e a via intrínseca.



A via extrínseca ocorre por meio da interação de ligantes extracelulares com receptores na superfície celular, esses receptores são chamados de receptores de morte. Os ligantes pertencem à grande família do fator de necrose tumoral, e os seus receptores são membros da família dos receptores de TNF. Os principais receptores de morte são o receptor de fator de necrose tumoral 1(TNF-R1), FAS ou CD95, receptores de TRAIL (TUMMERS *et al.*, 2017). Após a ligação do ligante, os receptores sofrem mudanças estruturais que expõem domínios de morte (do inglês death domains). Esses domínios de morte interagem com uma proteína adaptadora por meio de interação homotípica. No caso dos receptores TRAIL e CD95 essa proteína adaptadora é FADD (NAGATA, 2018). Caspase 8 é recrutada para o complexo formado por FADD por meio da interação com o domínio DED. Caspase 8 é ativada por autoclivagem. O complexo formado por caspase 8, FADD e CD95 é conhecido como complexo de sinalização indutor de morte (DISC). A caspase 8 ativada é capaz de clivar as caspases executoras 3 e 7 (GREEN, 2022b).

A via intrínseca é mediada pela difusão de proteínas presentes no espaço intermembrana da mitocôndria. É ativada pelas células expostas a metais pesados, ao dano no DNA, redução dos fatores de crescimento, hipóxia, acumulação de proteínas mal enoveladas dentre outro. Após esses eventos ocorre ativação de proteínas da família BCL-2, BAK e BAX, que causam poros na membrana externa mitocondrial ocasionando a difusão do citocromo C presente no espaço intermembrana para o citoplasma, onde exerce função no transporte de elétrons e produção de energia. Citocromo C interagem com o domínio WD da proteína adaptadora Apaf-1 (Fator ativador de protease apoptótica-1) que após mudanças conformacionais, recruta e ativa caspase 9 por meio do domínio CARD (domínio de recrutamento de caspase). O complexo caspase 9 e Apaf-1 é conhecido como apoptossomo. Caspase 9 ativada pode clivar as caspase executoras 3 e 7 para causar morte.

Grande parte dos estudos de lectinas de morte envolvem trabalhos de lectinas de origem vegetal. No presente estudo avaliamos o efeito de morte causados pelas proteínas recombinante MIC1 e MIC4 de *T. gondii*. Nossos dados indicam que as MIC1 e MIC4 interagem com receptores

# Objetivos

### **Objetivo Geral**

Avaliar o efeito citotóxico das proteínas de micronema MIC1 e MIC4 de *T. gondii* em linhagem leucêmica de células T humana – células Jurkat.

### **Objetivos específicos**

Investigar MIC1r e MIC4r em relação:

- ao mecanismo de interação com glicanas presentes na superfície das células Jurkat,
- ao efeito citotóxico em diferentes tempos de incubação com as células Jurkat, e
- aos mecanismos de indução da via de morte de celular

# **Materiais e Métodos**

## **Materiais e métodos**

### **3.1 Expressão, isolamento purificação e reenovelamento de MIC1 e MIC4 recombinantes**

Uma colônia das bactérias *Escherichia coli* da linhagem *Rosetta* transformadas com plasmídeo pEXP17-*MIC1* ou pEXP17-*MIC4* (cepa *Rosetta*) foi ressuspensa cultivada em 5mL de meio líquido LB (Himedia) contendo 100µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich) (caldo LB amp), sob agitação (240 rpm), a 37°C, por uma noite. No dia seguinte, o inóculo de 5mL foi adicionado a 500mL de caldo LB-amp, mantido a 37°C, 240 rpm, até atingir D.O. a 600nm entre 0,6 a 0,8. Posteriormente, foi adicionado 0,1mM de IPTG (isopropil-β-D-1-thiogalactoside, Sigma-Aldrich), para indução da expressão das proteínas recombinantes. A cultura bacteriana mantida a 37°C, a 200 rpm, durante 6 horas, foi centrifugada (7.000 × g, 15 minutos) e o sedimento foi congelado em *ultrafreezer* a -80°C. Alíquotas foram coletadas da cultura antes e após indução para verificar se houve a expressão de MIC1r e MIC4r. Essas amostras (1mL cada) foram centrifugadas a 8.000 × g, por 5 minutos, à temperatura ambiente, e os sedimentos ressuspensos em 50µL de tampão de amostra (0,25M de Tris-HCl, pH 6,8, 12,5% de SDS, 50% de glicerol e 0,05% de azul bromofenol) e incubados em banho maria a 100°C, por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 × g, por 10 minutos, e estocadas a -20°C até o momento da análise por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% sob condições dissociantes (SDS-PAGE a 12%). Após a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi corado com azul de Coomassie a 0,1% em solução aquosa contendo 45% de metanol e 10% de ácido acético, durante 1 hora. O gel foi descorado com solução aquosa de ácido acético a 7,5%.

As proteínas MIC1r e MIC4r encontradas na fração insolúvel foram purificadas e submetidas ao reenovelamento pelo método de diálise. O sedimento bacteriano foi ressuspensa em tampão de lavagem (20mM de Tris, 500mM de NaCl, 0,2% de Triton X-100 e 0,1mM de PMSF, pH 8,3), seguido de sonicação em banho de gelo (4 pulsos de 40 segundos cada) e centrifugação a 7.000 × g, por 15 minutos. Esse procedimento foi repetido três vezes. Posteriormente, os corpos de inclusão foram ressuspensos em tampão de solubilização (20mM de Tris, 500mM de NaCl e 8M de ureia, pH 8,3), sendo a solução incubada em agitação, por uma noite, à temperatura ambiente. Após completa solubilização dos corpos de inclusão, a amostra foi novamente centrifugada a 4.000 × g, por 40 minutos, à temperatura ambiente, para a remoção de qualquer material insolúvel. As proteínas recombinantes foram isoladas por cromatografia de afinidade em coluna de

níquel imobilizado (Ni Sepharose High Performace, GE Healthcare). Após cromatografia, as proteínas recombinantes isoladas foram diluídas em tampão de solubilização, adicionadas em cassetes de diálise (Thermo Fisher Scientific) e dialisadas contra o tampão de solubilização, com concentrações decrescentes de ureia até diálise final contra tampão Tris-HCl a 20mM contendo NaCl a 500mM, pH 8,3. As amostras foram então submetidas à cromatografia de afinidade em coluna com polimixina B imobilizada (Sigma-Aldrich), segundo instruções do fabricante, para eliminar possível contaminação com lipopolissacarídeo (LPS). A concentração proteica foi dosada pelo método BCA (*Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination*, Sigma-Aldrich) e as amostras armazenadas a -20°C até o momento do uso. Todos os lotes purificados passaram por dosagem de LPS com o kit Pierce Chromogenic *Endotoxin Quant Kit* (Thermo Fisher Scientific) e apresentaram concentração de 0,3U/mL de LPS.

### 3.2 Ensaio de atividade lectínica de MIC1r e MIC4r

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, seguindo o protocolo para ELISA. A microplaca foi revestida com glicoproteínas fetuína ou assialofetuína com a quantidade final de 1µg de glicoproteína por poço, diluída em 50µL de tampão carbonato a 0,2M, pH 9,6. Após a incubação por toda a noite, a 4°C, os poços foram bloqueados com 100µL de solução de gelatina a 10% por 1 hora. Após lavagem com PBS-T (PBS contendo Tween 20 a 0,05%), MIC1 ou MIC4 (1µg/poço) foram adicionadas a microplaca, sendo esta incubada por 2 horas, à temperatura ambiente. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS-T e, em seguida, foi adicionado o anticorpo IgY de galinha contra MIC1 ou MIC4, conjugados com peroxidase, nos respectivos poços na diluição de 1:1.000. As reações foram incubadas por 1 hora. Após lavagem (três vezes com PBS-T) dos poços, a reação foi revelada com 100µL de TMB (Sigma-Aldrich) contendo o substrato peróxido de hidrogênio, por 30 minutos, à temperatura ambiente, em local protegido da luz. As reações foram bloqueadas com 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2M por poço e as leituras realizadas a 450nm em leitor de microplacas (Power Wavex- BIOTEK, Winoosk, Estados Unidos).

### 3.3 Determinação de viabilidade celular com MTT

As células Jurkat, na concentração de  $2,5 \times 10^5$ /mL, foram cultivadas em 100µL de meio RPMI 1640 suplementado com 4,5g/L de glicose (Sigma-Aldrich Aldrich, St. Louis, EUA), 100U/ml de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) (meio denominado de RPMI-c) em microplacas de 96 poços. As células foram estimuladas com concentrações

diferentes das proteínas MIC1r ou MIC4r, por 24 horas. Quatro horas antes do fim do cultivo, foram adicionados 5µL de solução de MTT a 5mg/mL (Sigma-Aldrich) em cada poço da cultura celular. Terminado o tempo de estimulação, as placas foram centrifugadas a  $300 \times g$ , por 10 minutos, à temperatura ambiente. Os sobrenadantes das culturas foram retirados e em cada poço foi adicionado 100µL de DMSO (Sigma-Aldrich). As placas foram agitadas protegidas da luz por 10 minutos e em seguida foram lidas em absorbância a 570nm em leitor de microplacas (Power Wavex- BIOTEK, Winooski, EUA). Nos experimentos onde se investigou se o efeito de morte era dependente do reconhecimento de carboidratos, realizamos o estímulo das células com 5µg/mL de MIC1r e diferentes concentrações de fetuína (Sigma Aldrich) ou 5µg/mL de MIC4r com assialofetuína (Sigma Aldrich). O mesmo experimento foi realizado com as linhagens mielocíticas THP1 e U937. Nos experimentos

#### 3.4 Avaliação do efeito de inibidores de diferentes vias de sinalização no efeito de morte causado pelas MICs das células Jurkat após estímulo com MIC1r ou MIC4r.

Em alguns experimentos buscou-se identificar os mecanismos de morte celular por meio da inibição farmacológica de MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos - do inglês *mitogen-activated protein kinases*). Para isso, suspensões de células Jurkat na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/mL foram incubadas por 1 hora com diferentes inibidores. Todos os inibidores foram adquiridos da Sigma-Aldrich, são eles: 3µM JNK-IN-8, inibidor de JNK (C-Jun N-terminal cinase); 10µM SB239063, inibidor de p38 MAPK; e PD98059, inibidor de ERK 5µM (proteína cinase regulada por sinal extracelular). Foram usados também os reagentes: 2µM LY 294002 para inibição de PI3K (fosfatidil-inositol 3 cinase) e Emricasan para inibição de caspase. Todos inibidores foram incubados com células Jurkat, 1 hora antes do estímulo com 5µg/mL de MIC1r ou MIC4r. A determinação da viabilidade após inibição das vias de ERK e PI3K foi realizada com o protocolo de determinação de viabilidade pelo método de MTT. A avaliação da morte celular dos inibidores de JNK e p38 foi realizada com marcação de iodeto de propridio (PI), seguida da aquisição no citômetro Guava EasyCyte Mini System (Merck-Millipore, Burlington, EUA). A análise foi feita com o auxílio do programa FlowJow v.10 (FlowJow LCC, Ashland, EUA).

### 3.5 Avaliação do efeito de crescimento das células Jurkat após estímulo prolongado com MIC1r ou MIC4r.

Cultivos de células Jurkat na densidade de  $3 \times 10^4$  células/mL foram estimuladas com diferentes concentrações de MIC1r ou MIC4r e cultivadas por 7 dias. Esse grupo foi comparado com um grupo de células estimuladas por 1 hora com diferentes concentrações de MIC1r e MIC4r, seguido por lavagem e cultivo por 7 dias consecutivos. Quatro horas antes do fim de todos os cultivos, foram adicionados 5µL de solução de MTT a 5mg/mL (Sigma-Aldrich) em cada poço da cultura celular. Terminado o tempo de estimulação, as placas foram centrifugadas a  $300 \times g$ , por 10 minutos, à temperatura ambiente. Os sobrenadantes das culturas foram retirados e em cada poço foi adicionado 100µL de DMSO (Sigma-Aldrich). As placas foram agitadas protegidas da luz por 10 minutos e em seguida foram lidas em absorbância a 570nm em leitor de microplacas (Power Wavex-BIOTEK, Winooski, EUA).

### 3.6 Ensaio de ligação de MIC1r e MIC4r a células Jurkat

Suspensões celulares de  $5 \times 10^5$  células Jurkat/mL foram fixadas à temperatura ambiente em solução de paraformaldeído (Sigma Aldrich) a 4% em PBS, por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas em PBS e incubadas com diferentes concentrações de MIC1r ou MIC4r biotinizadas, a 4°C, 25°C ou 37°C. Após 2 horas, as células foram lavadas e incubadas com 5µg/mL de estreptoavidina-FITC (Thermo Fisher), por 40 minutos. As células foram lavadas duas vezes com PBS para retirar a estreptoavidina-FITC livre, adquiridas no citômetro Guava EasyCyte Mini System (Merck-Millipore) e analisadas com o auxílio do programa FlowJow v.10 (FlowJow LCC). Nos experimentos onde se buscou a avaliar o efeito do reconhecimento de carboidratos, as glicoproteínas fetuína ou assialofetuína foram adicionadas ao mesmo tempo que MIC1r ou MIC4r biotinizadas, respectivamente. No caso do tratamento com glicosidases, as células foram submetidas à digestão com uma solução contendo neuraminidase (Sigma-Aldrich) a 0,5U em tampão acetado a 0,1mM, pH 5,5, a 37°C, por uma hora. Em um outro experimento, a digestão foi realizada com uma solução de β-galactosidase (Sigma-Aldrich) a 15U em tampão citrato a 5mM, pH 6,0. Após a digestão, as células foram lavadas, incubadas com as lectinas biotinizadas, estreptoavidina-FITC, como descrito acima. As células foram adquiridas no citômetro Guava EasyCyte Mini System (Merck-Millipore) e analisadas com o auxílio do programa FlowJow v.10 (FlowJow LCC). Em alguns experimentos, MIC1r não marcada (30µg/mL) foi usada como competidor para MIC4r biotinizada



(30µg/mL) ou MIC4r não marcada (30µg/mL) como competidor para MIC1r biotilada (30µg/mL).

### 3.7 Marcação de células Jurkat com anexina V e PI

A avaliação do aumento da marcação de anexina V e PI foi realizada com o FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Bioscience). Suspensões células Jurkat na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/mL foi estimulada com 5µg/mL de MIC1r ou MIC4r. Como controle positivo foi utilizado 10µg/mL de As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Após 24 horas de estímulo as células foram marcadas com o anexina V-FITC e PI, por 1 hora, conforme preconizado pelo fabricante. Após duas lavagens, as suspensões celulares foram adquiridas no citômetro Guava EasyCyte Mini System (Merck-Millipore) e analisadas com o auxílio do programa FlowJow v.10 (FlowJow LCC).

### 3.8 Marcação com caspase

Para avaliação do aumento da marcação de caspase 3/7 ou caspase 8, suspensões de células Jurkat na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/mL foram estimuladas com 5µg/mL de MIC1r ou MIC4r. Como controle positivo foram utilizados 10µg/mL de As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para geração de caspase3/7 e 15µg/mL de cicloheximida, para caspase 8. Após 24 horas de estímulo, as células foram marcadas com as sondas FAM-Caspase 8 e FAM-Caspase3/7 por 1 hora. Após duas lavagens, as suspensões celulares foram adquiridas no citômetro Guava EasyCyte Mini System (Merck-Millipore) e analisadas com o auxílio do programa FlowJow v.10 (FlowJow LCC).

### 3.9 Avaliação do potencial mitocondrial

Suspensões de células Jurkat na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/mL foram estimuladas com diferentes concentrações de MIC1r ou MIC4r. Após 24 horas de incubação, à suspensão foi adicionado a sonda DIOC<sub>6</sub>, na concentração de final de 50nM. Após 10 minutos, as células foram lavadas com PBS, a 37°C, centrifugadas a  $300 \times g$  e ressuspendidas com meio RPMI-c. Em seguida, as células foram coletadas e adquiridas no citômetro Guava EasyCyte Mini System (Merck-Millipore) e analisadas com o auxílio do programa FlowJow v.10 (FlowJow LCC).

### 3.10 Deteccção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Células da linhagem THP1 ou Jurkat, na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/mL, foram marcadas com a sonda DFCDA (Sigma-Aldrich), na concentração de 5µM, por 45

minutos. Após incubação, as células foram centrifugadas a  $300 \times g$  e ressuspensas em RPMI ao abrigo da luz. As células foram plaqueadas e estimuladas por 2 horas com diferentes concentrações de MIC1r ou MIC4r. Em seguida, as placas foram lidas no aparelho BioTek FLx800 TB Microplate Fluorescence Reader (BIOTEK, Winooski, Estados Unidos). Nos experimentos onde se buscou a inibição do complexo NADPH oxidase por *difenil iodônio* (DPI) a  $20\mu\text{M}$ , de ROS mitocondrial por MITOTEMPO- (MIT) a  $20\mu\text{M}$  ou N-acetil-cisteína (NAC) a  $1\text{mM}$ , o bloqueio foi feito concomitante a incubação com DFCDA. Todos inibidores foram adquiridos da Sigma Aldrich.

### 3.11 Análise de fragmentação de cromatina

Células Jurkat, na densidade de  $5 \times 10^6$  células/mL, foram estimuladas por 16 horas com  $5\mu\text{g/mL}$  de MIC1r ou MIC4r. Após esse tempo, as células foram coletadas e lavadas em PBS gelado. Em seguida, as células foram centrifugadas a  $300 \times g$ , por 10 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi retirado e as células foram rompidas com  $200\mu\text{L}$  de tampão de lise ( $100\text{mM}$  de NaCl,  $20\text{mM}$  de Tris,  $10\text{mM}$  de EDTA,  $0,5\text{M}$  de SDS e  $1\%$  de Triton X-100, pH 8,0). Em seguida foi adicionado  $1\mu\text{g/mL}$  de RNase (Sigma-Aldrich) e o lisado celular deixado em banho seco por 1 hora. Então, adicionou-se  $10\mu\text{g/mL}$  de proteinase K (Thermo Fisher Scientific), sendo as amostras incubadas por 16 horas a  $56^\circ\text{C}$ . Após esse tempo, o lisado foi arrefecido à temperatura ambiente e as amostras foram corridas em gel de agarose a  $1,5\%$  em tampão TAE (Tris-acetato a  $40\text{mM}$  e EDTA a  $1\text{mM}$ , pH 8,0). Ao gel, em temperatura aproximada de  $50^\circ\text{C}$ , adicionou-se o corante *SYBR Safe DNA gel stain* (Thermo Fisher Scientific) a  $0,1\%$ . As corridas foram realizadas a  $45\text{V}$ ,  $100\text{mA}$ ,  $150\text{W}$ , por 2 horas e 40 minutos. A aquisição de imagem dos géis foi feita em ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA), utilizando-se o software Image Lab (Bio-Rad Laboratories).

### 3.12 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o programa Prisma 8.0 (Graph Pad Software). Todas as variáveis foram testadas a distribuição normal e a variância homogênea. O teste aplicado foi o *One-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos em média e  $\pm$  desvio padrão), com as diferenças observadas sendo consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .



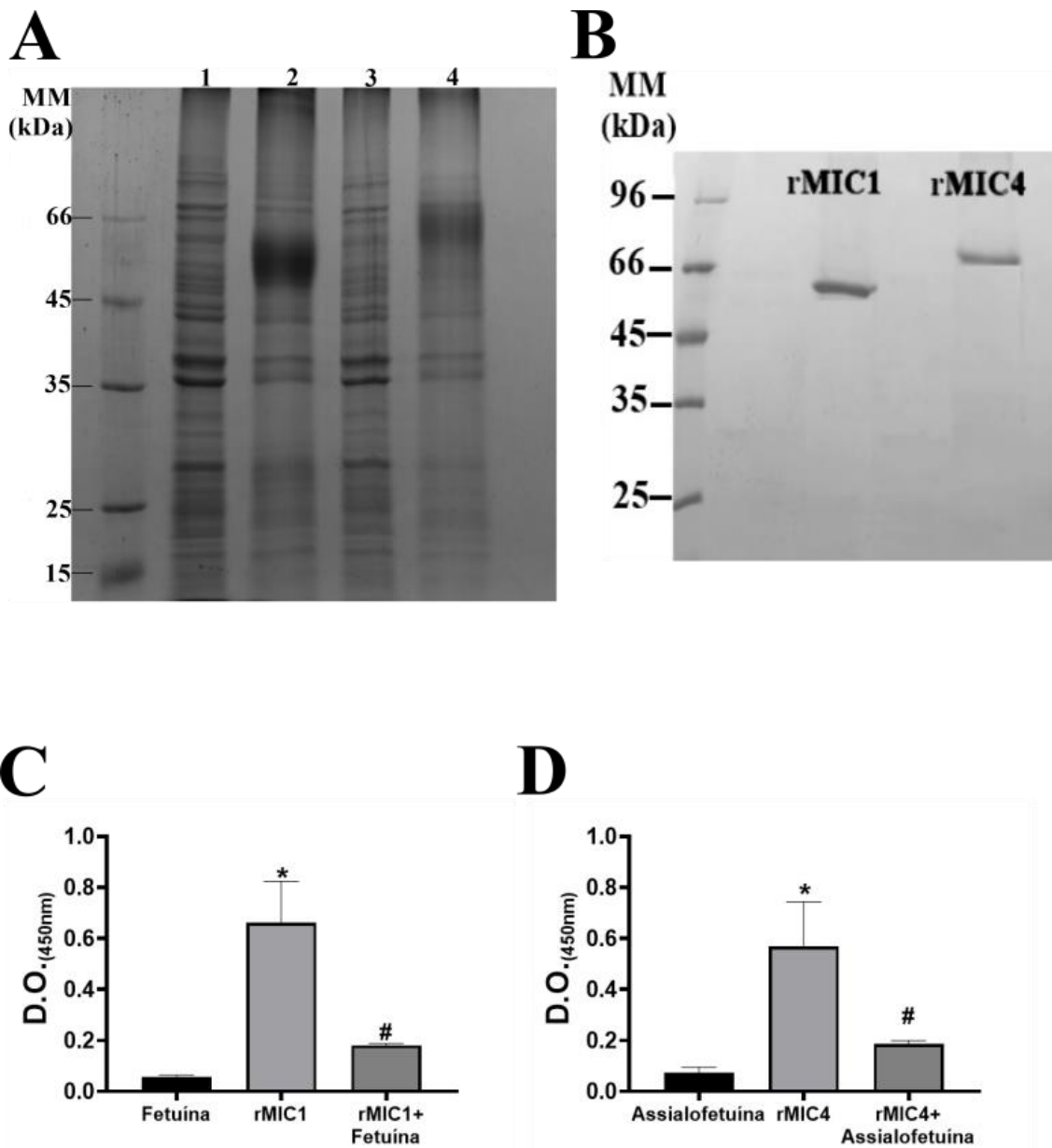
# **Resultados**

## 4. Resultados

### **Expressão, isolamento e avaliação do enovelamento correto de MIC1r e MIC4r**

As proteínas MIC1r e MIC4r foram expressas em bactérias *E. coli* BL21 (DE3) *Rosetta* e isoladas a partir de corpúsculos de inclusão. Para confirmar que o processo de purificação foi adequado e não gerou nenhum tipo de contaminação ou possível degradação das proteínas recombinantes, foi realizada uma análise das amostras por SDS-PAGE a 12%. As bandas visualizadas apresentaram massas moleculares (MM) características; MIC1r foi observada com MM aparente de 50kDa enquanto MIC4r, 60kDa (Figuras 1A e 1B).

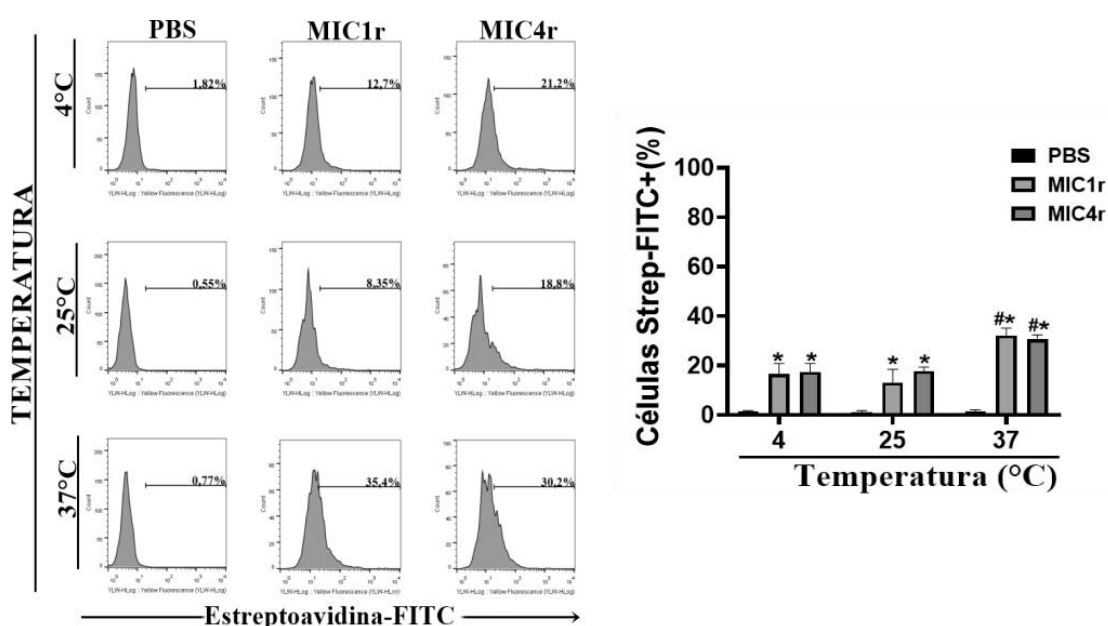
A atividade lectínica de MIC1 e MIC4 é dependente do seu correto enovelamento, porém, essas proteínas recombinantes foram extraídas pela solubilização de corpúsculos de inclusão com tampão que desnatura proteína pela presença de ureia em alta concentração (8M). Desse modo, após lento e longo processo de diálise de MIC1r e MIC4r contra tampões contendo ureia em concentrações que foram decrescendo até a total ausência desse agente desnaturante, avaliou-se a capacidade dessas lectinas recombinantes em reconhecer carboidratos, a fim de garantir-se a funcionalidade dessas proteínas. Para isso, as glicoproteínas alvo foram usadas para revestirem poços de microplacas, fetuína para MIC1r e assialofetuína para MIC4r, sendo feito o ensaio de ligação das rMICs. Pode-se observar que MIC1r e MIC4r foram capazes de interagir com fetuína e assialofetuína, respectivamente (Figura 1C). Para melhor explorar a propriedade de reconhecimento de açúcar de MIC1r e MIC4r, investigou-se por competição o efeito inibitório exercido pela incubação prévia das rMICs com as glicoproteínas específicas. Observou-se que a incubação prévia de MIC1r e MIC4r com as glicoproteínas reduziu significativamente a capacidade de MIC1r e MIC4r em reconhecer as glicoproteínas que revestiam os poços (Figura 1C). Estes resultados indicam que a expressão, isolamento e diálise dessas proteínas micronemas recombinantes resultaram em preparações homogêneas de moléculas com atividade lectínica.



**Figura 1: rMIC1 e rMIC4 foram purificadas e renoveladas de forma adequada.** A- SDS-PAGE a 12% do lisado total de bactérias com o vetor contendo o gene de MIC1r (1 e 2) ou MIC4r (3 e 4), não induzidas (1 e 3) ou induzidas ((2 e 4) com IPTG transformadas. B- MIC1r e MIC4r, após cromatografia por afinidade a níquel e renovelamento pelo método da diálise, foram analisadas em SDS-PAGE a 12%). C-D A atividade lectínica de MIC1 e MIC4 foi avaliada por interação com glicoproteínas contendo ácido siálico e galactose terminais. Os poços foram revestidos com fetuína ou assialofetuína, seguidos de incubação por duas horas com MIC1r (pré-incubada com PBS ou fetuína) e MIC4r (pré-incubada com PBS ou assialofetuína), respectivamente. As reações foram incubadas com IgY específica marcada com peroxidase e revelada com TMB. Resultados expressos em absorbância a 450nm, média ± Desvio Padrão e são representativos de dois experimentos. \*p<0,05 em relação ao branco. #p<0,05 em relação a MIC1r e MIC4r.

## Temperatura influência o reconhecimento de glicanas por MIC1r e MIC4r

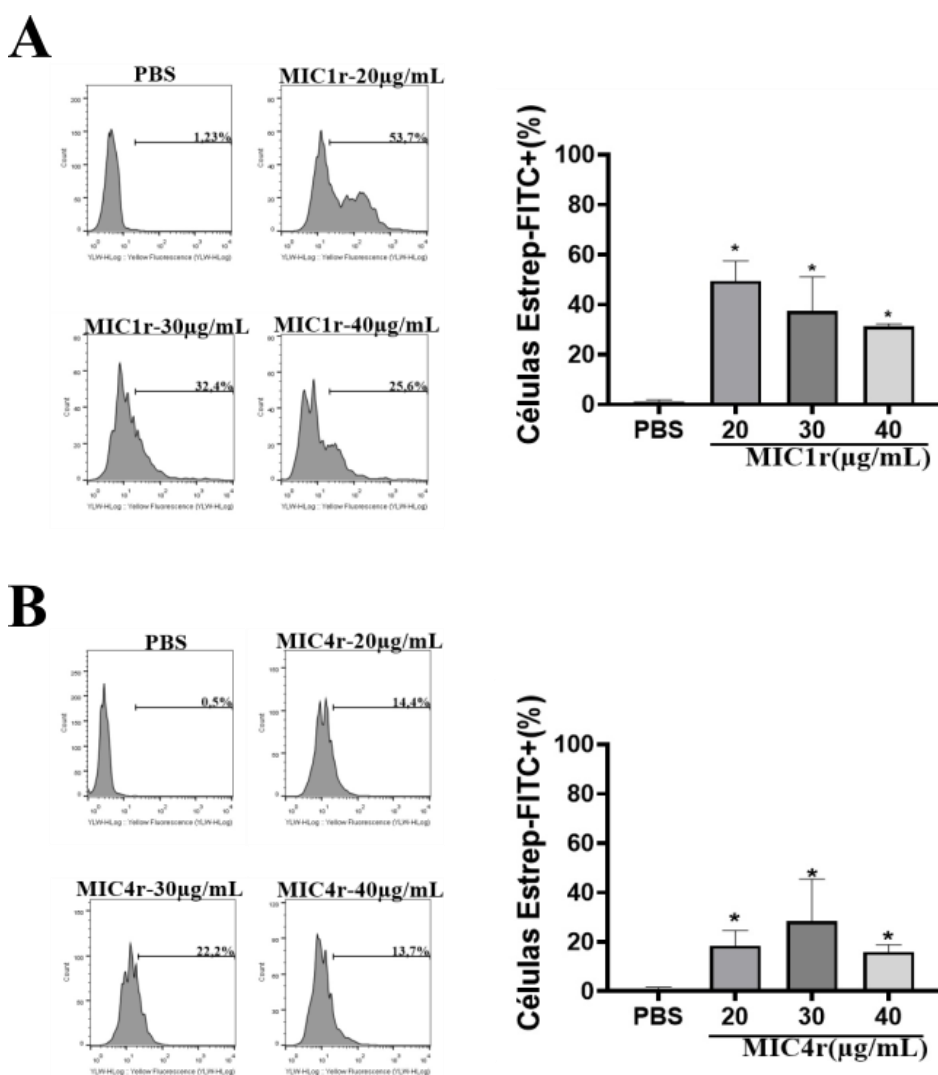
Resultados prévios do nosso grupo mostraram que MIC1 e MIC4 apresentam como uma de suas funções a interação com receptores glicosilados na superfície das células fornecendo uma interação mais forte entre célula e parasito (LOURENÇO *et al.*, 2001). Entretanto, não existem dados na literatura demonstrando quais fatores interferem na ligação entre parasito e linfócitos T humanos. Iniciou-se essa parte do estudo avaliando-se o efeito da temperatura na interação entre MIC1r e MIC4r e linfócitos T. Para tanto uso-se a linhagem de células T Jurkat. Tanto MIC1r quanto MIC4r tiveram uma melhor interação com células Jurkat a a 37°C quando comparada às temperaturas de 4° e 25°C (Figura 2).



**Figura 2: Proteínas de micronema de *T. gondii* sofrem influência da temperatura durante o reconhecimento de glicanas presentes na superfície de linhagens linfóides.** Cultivos celulares na densidade de  $5 \times 10^5$  células/mL foram fixadas com paraformaldeído em PBS a 4% por 1 hora. Em seguida, as células foram incubadas com  $30 \mu\text{g/mL}$  de rMIC1 ou rMIC4 biotinizadas. As células foram incubadas em três diferentes temperaturas 4°, 25°C e 37°C por 2 horas. Após incubação as células foram lavadas e marcadas com estreptoavidina-FITC por 40 minutos. Após duas lavagens consecutivas, as suspensões de células marcadas foram adquiridas no citômetro Guava EasyCyte Mini e os dados foram analisados com auxílio do programa FlowJow. Resultados expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo marcado apenas com estreptoavidina. #  $P < 0,05$  em relação ao grupo incubado na temperatura de 4 e 25°C.

## O aumento da concentração não aumenta a ligação de MICs com receptores de células jurkat

Em seguida, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações das lectinas na ligação das células linfocíticas. MIC1r possui melhor interação a 20µg/mL que vai sendo reduzida gradualmente com o uso concentrações maiores. Para MIC4r, nota-se que a variação nas concentrações testadas, de 20 a 40µg/mL, parece não exercer um efeito significativamente diferente na ligação, embora a maior média tenha sido obtida a 30µg/mL (Figura 3).

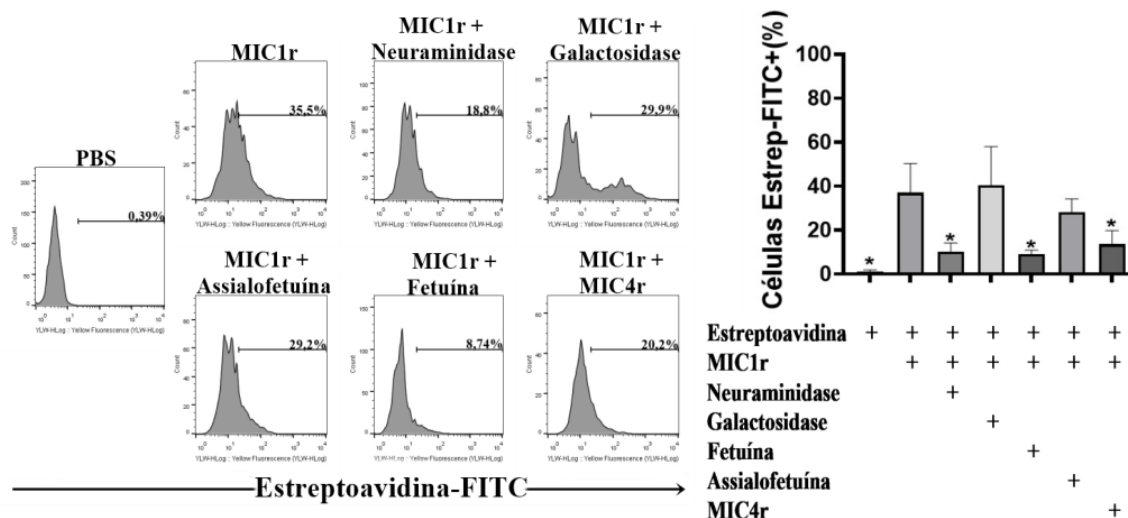


**Figura 3:** A ligação de proteínas de rMIC1 em glicanas da superfície das células parece ser influenciada pela concentração usada para o reconhecimento de glicanas presentes na superfície das células. Cultivos celulares na densidade de  $5 \times 10^5$  células/mL foram fixadas com paraformaldeído. Em seguida, as células foram incubadas com 20, 30 e 40µg/mL de MIC1r ou MIC4r biotiniladas. As células foram incubadas em três diferentes temperaturas 4°, 25°C e 37°C por 2 horas. Após incubação as células foram lavadas e marcadas com streptavidina-FITC por 40 minutos. Após duas lavagens das células com PBS as células foram adquiridas no citômetro. Resultados expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo marcado apenas com streptavidina.



## **MIC1r e MIC4r interagem com receptores glicosilados na superfície de linfócitos humanos na dependência do reconhecimento de carboidrato.**

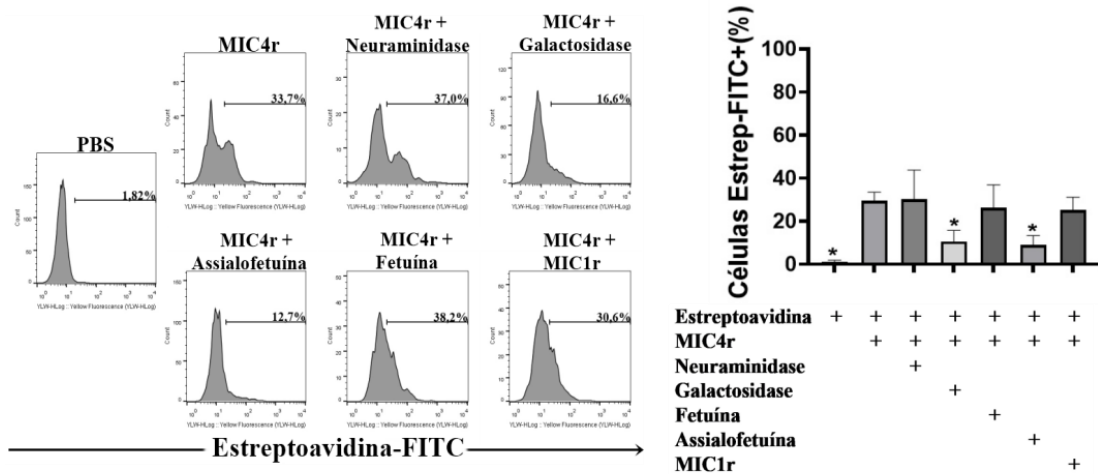
Na literatura é mostrado que MIC1 e MIC4 interagem com receptores na superfície por meio dos seus domínios de reconhecimento de carboidratos. Baseado nesses dados, foi avaliado se essas MICs teriam uma diminuição de sua ligação a células Jurkat submetidas, submetidas ou não a digestão com neuraminidase ou  $\beta$ -galactosidase, bem como pela pré-incubação com glicoproteínas como competidores. Em relação à MIC1r, observa-se que essa molécula marcada teve uma ligação significativamente menor a células Jurkat quando coincubadas com fetuína, o que não foi observado quando a coincubação foi feita com assialofetuína (Figura 4). Tendo em vista que a assialofetuína é uma glicoproteína gerada a partir de dessialilação de fetuína, esses dados sugerem que a ligação de MIC1r às células Jurkat é dependente do reconhecimento de ácido siálico presentes na superfície das células Jurkat pelo CRD de MIC1r. Essa conclusão tornou-se mais evidente quando observou-se que MIC1r tinha uma ligação menor a células Jurkat tratadas com neuraminidase quando comparada às células tratadas com  $\beta$ -galactosidase ou sem tratamento (Figura 4). Um achado interessante foi que a incubação concomitante de MIC1r biotinizada com MIC4r não marcada reduziu significativamente a interação de MIC1r com as células Jurkat quando comparada com a incubação das células apenas com MIC1r marcada (Figura 4).



**Figura 4: Interação de rMIC1 com glicanas na superfície das células é dependente do reconhecimento de carboidrato e é reduzida quando rMIC4 é adicionada.** Cultivos celulares na densidade de  $5 \times 10^5$  células/mL foram fixadas com paraformaldeído. Em seguida, as células foram incubadas com  $30 \mu\text{g/mL}$  de rMIC1 biotinizadas em presença de  $400 \mu\text{g/mL}$  de fetúina ou assialofetúina por 2 horas. Nos experimentos onde se investigou o efeito da digestão de ácido siálico e galactose com as enzimas neuraminidase e  $\beta$ -galactosidase, as células fixadas foram digeridas por 1 hora com neuraminidase ou  $\beta$ -galactosidase. Após digestão as células foram lavadas com PBS e incubadas com rMIC1 biotinizadas por 2 horas. No grupo onde se avaliou o efeito da presença de rMIC4 na ligação de rMIC1 biotinizadas, incubamos  $30 \mu\text{g/mL}$  de rMIC4 não marcadas com  $30 \mu\text{g/mL}$  de rMIC1 marcadas com biotina. Após o tempo de incubação realizamos a lavagem das células com PBS e marcação com streptavidina por 45 minutos. Após duas lavagens consecutivas, as suspensões de células marcadas foram adquiridas no citômetro Guava EasyCyte Mini e os dados foram analisados com auxílio do programa FlowJow. Resultados expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Asterisco indica um  $p < 0,05$  em relação ao grupo marcado com MIC4r biotinizada e estreptavidina.

Experimentos semelhantes foram feitos com MIC4r. Nesse caso, houve redução da ligação de MIC4r à superfície das células Jurkat quando assialofetúina foi adicionada, mas não com fetúina, quando comparado aos controles sem competidor (Figura 5). Com relação à digestão com glicosidases, MIC4r teve uma menor ligação às células Jurkat tratadas com  $\beta$ -galactosidase, mas não com às tratadas neuraminidase (Figura 5). Esses resultados sugerem que a ligação de MIC4r às células Jurkat é dependente do reconhecimento de  $\beta$ -galactopiranosídeo presentes na superfície das células Jurkat pelo CRD de MIC4r. Um resultado contrastante foi que a coincubação de MIC4r biotinizada com MIC1r não marcado não acarretou na redução da interação de MIC4 com as células Jurkat (Figura 5). Assim, sugere-se que essas lectinas possam competir pelo mesmo sítio ou uma possível associação dessas moléculas diminuiria a ligação de MIC1r. Em conjunto, esses resultados mostram que MIC1r e MIC4r interagem com moléculas

glicosiladas na superfície das células Jurkat na dependência do CRDs dessas rMICs. Além disso, os nossos dados indicam que MIC1r e MIC4r parecem modular a interação de uma lectina quando em presença da outra.

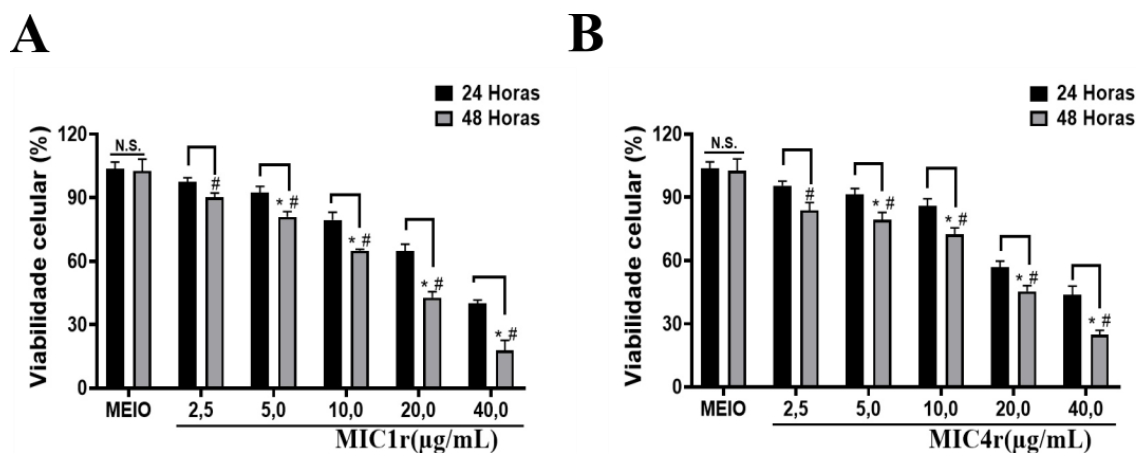


**Figura 5: Interação de rMIC1 com glicanas na superfície das células é dependente do reconhecimento de carboidrato e é reduzida quando rMIC4 é adicionada.** Cultivos celulares na densidade de  $5 \times 10^5$  células/mL foram fixadas com paraformaldeído. Em seguida, as células foram incubadas com  $30 \mu\text{g/mL}$  de rMIC4 biotinizadas em presença de  $400 \mu\text{g/mL}$  de fetúina ou assialofetúina por 2 horas. Nos experimentos onde se investigou o efeito da digestão de ácido siálico e galactose com as enzimas neuraminidase e  $\beta$ -galactosidase, as células fixadas foram digeridas por 1 hora com neuraminidase ou  $\beta$ -galactosidase. Após digestão as células foram lavadas com PBS e incubadas com rMIC4 biotinizadas por 2 horas. No grupo onde se avaliou o efeito da presença de rMIC1 na ligação de rMIC4 biotinizadas, incubamos  $30 \mu\text{g/mL}$  de rMIC1 não marcadas com  $30 \mu\text{g/mL}$  de rMIC4 marcadas com biotina. Após o tempo de incubação realizamos a lavagem das células com PBS e marcação com streptavidina por 45 minutos. Após duas lavagens consecutivas, as suspensões de células marcadas foram adquiridas no citômetro Guava EasyCyte Mini e os dados foram analisados com auxílio do programa FlowJow. Resultados expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Asterisco indica um  $p < 0,05$  em relação ao grupo marcado com MIC4r biotinizada e estreptavidina.

## MICs aumentam a perda de viabilidade de linfócitos humanos

Diversos trabalhos demonstram o papel de lectinas na toxicidade de células cancerosas, efeito este que parece decorrer da ativação de vias apoptóticas e autofágicas (NASCIMENTO *et al.*, 2019; TATSUTA *et al.*, 2013). Até o momento não existe na

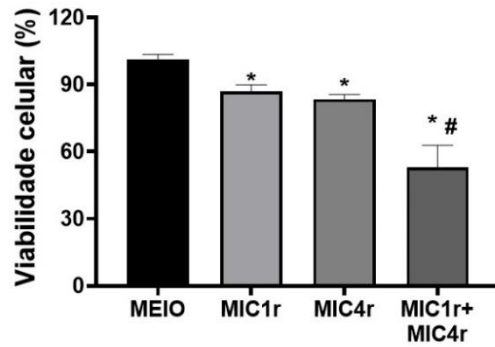
literatura nenhum estudo sobre o efeito de morte induzido por lectinas de *T. gondii*. Dessa maneira, buscou-se analisar esse fenômeno através das incubações de células Jurkat com concentrações diferentes de MIC1r e MIC4r. Os resultados da figura 6 mostram que MIC1r e MIC4r induzem perda de viabilidade da linhagem de linfócito T humano com o aumento do tempo de incubação e com aumento da concentração.



**Figura 6: Células Jurkat perdem viabilidade após estímulo com MIC1r ou MIC4r.** Células Jurkat ( $1 \times 10^5$  células/mL) foram estimuladas com concentrações crescentes de lectinas durante 24 ou 48 horas. A porcentagem de viabilidade foi obtida pela leitura de absorbância em 570nm do lisado celular, onde se acumula formazan como produto da redução de MTT. Resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$  em relação às culturas não estimuladas em 24 ou 48 horas. # \* $P < 0,05$  em relação às culturas estimuladas por 24 horas.

### Estímulo ao com MIC1r e MIC4r aumentam o efeito citotóxicos das mics

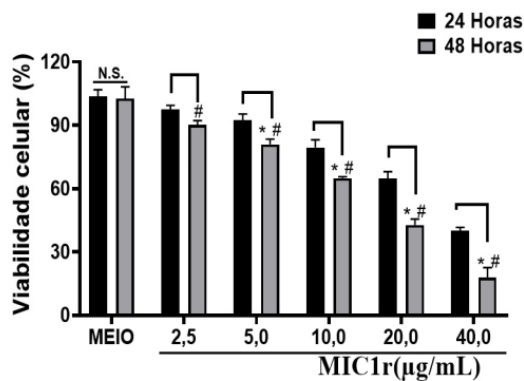
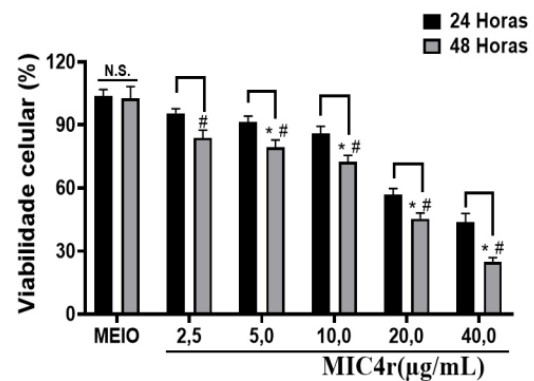
A descoberta do efeito modulador de MIC4r na interação de MIC1r com glicanas sialiladas das células Jurkat, levou a hipótese de que a coincubação de MIC1r e MIC4r com as células Jurkat poderiam modificar o efeito citotóxico visto anteriormente quando as lectinas foram incubadas separadamente com essas células. Os resultados mostram que a coincubação de MIC1r e MIC4r com as células Jurkat diminuiu significativamente a viabilidade dessas células quanto comparada às culturas de células controles não estimuladas ou daquelas estimuladas com cada uma das lectinas isoladamente (Figura 7).



**Figura 7: Dupla estimulação com as proteínas de micronema aumenta o efeito de citotóxicos em células Jurkat.** Células Jurkat ( $1 \times 10^5$  células/mL) foram estimuladas com 5  $\mu\text{g/mL}$  de MIC1r, MIC4r ou concomitantemente com 5  $\mu\text{g/mL}$  rMIC1 e 5  $\mu\text{g/mL}$  rMIC4 por 24 horas. A porcentagem de viabilidade foi obtida pela leitura de absorbância em 570nm do lisado celular, onde se acumula formazan como produto da redução de MTT. Resultados expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Asterisco indica um  $p < 0,05$  em relação às culturas não estimuladas (meio). # indica um  $p < 0,05$  em relação às culturas estimuladas com MIC1r ou MIC4r.

### **Redução da viabilidade causado pelas MICs é dependente do reconhecimento de carboidratos**

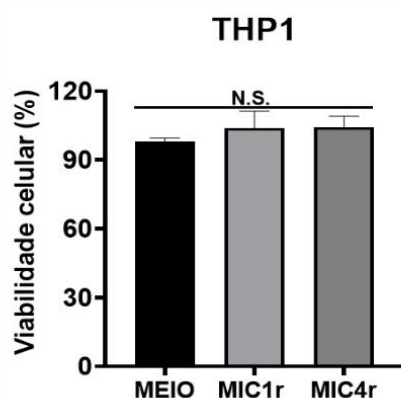
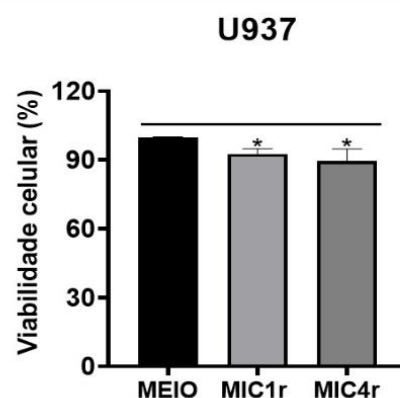
Lectinas podem exercer citotoxicidade por meio da reconhecimento de um ou mais receptores glicosilados presentes na superfície das células (SHI *et al.*, 2017). Desse modo, avaliou-se se o efeito de perda de viabilidade era dependente do reconhecimento de carboidratos. Foram feitos estímulos na presença de glicoproteínas que são reconhecidas por MIC1r e MIC4r. Como mostrado na da figura 8, para se reverter o efeito citotóxico de 20 $\mu\text{g/mL}$  de MIC1r e 30  $\mu\text{g/mL}$  de MIC4r foram necessários pelo menos 125 $\mu\text{g/mL}$  fetuína e 62,5 $\mu\text{g/mL}$  de assialofetuína, respectivamente. Em conjunto estes dados demonstram que essas MICs causam perda de viabilidade por meio do reconhecimento de carboidratos.

**A****B**

**Figura 8: MIC1r e MIC4r causam perda da viabilidade celular após estímulo de Jurkat.** Cerca de  $1 \times 10^5$  células/mL da linhagem Jurkat foram estimuladas com 5 µg/mL de rMIC1 ou rMIC4 em presença de concentrações crescentes de Fetuína e Assialofetuína. A percentagem de viabilidade foi obtida pela leitura de absorbância em 570nm do lisado celular, onde se acumula formazan como produto da redução de MTT. Resultados expressos em média  $\pm$  SD e são representativos de três experimentos. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo incubado somente com assialofetuína ou fetuína.

### MICs não causam perda de viabilidade em todas as linhagens humanas

A descoberta dos efeitos citotóxicos observados em células Jurkat abriu perspectivas de que o fenômeno pudesse também ocorrer com outras linhagens não relacionadas. Dessa forma, avaliou-se o efeito de MIC1r e MIC4r nas linhagens mielóides U937 e THP1. Foi interessante observar que as células THP1 foram refratárias aos efeitos de perda de viabilidade causados por essas MICs, enquanto a linhagem U937 se mostrou sensível ao efeito citotóxico (Figura 9). Esses dados sugerem que o efeito de citotóxico de MIC1r e MIC4r não ocorre de forma homogênea em todas as linhagens.

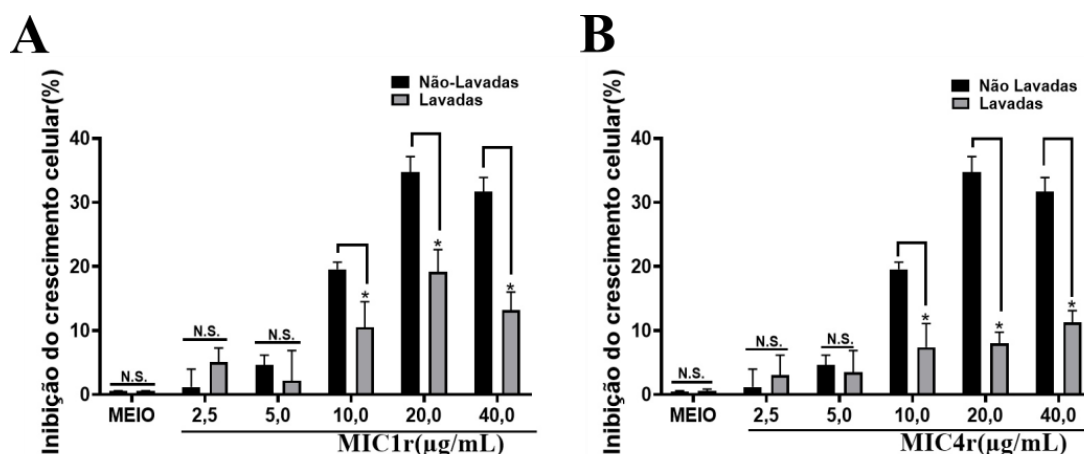
**A****B**

**Figura 9: MIC1r e MIC4r produzem efeitos citotóxico na linhagem mielóide U937 (A), mas não na THP1 (B).** Células da linhagem THP1 e U937 ( $1 \times 10^5$  células/mL) foram estimuladas com 5µg/mL de MIC1r ou MIC4r. A percentagem de viabilidade foi obtida pela leitura de absorbância em 570nm do lisado celular, onde se acumula formazan como produto da redução de MTT. Resultados são expressos com Média

± Desvio Padrão e são representativos de três experimentos. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. \* P<0,05 em relação ao grupo controle não estimulado.

### A forma recombinante das micronemas 1 e 4 de *T. gondii* modificam o crescimento da linhagem Jurkat

Os dados obtidos aqui demonstram que as MICs são capazes de reduzir a viabilidade de células Jurkat e U937 nos tempos de 24 e 48 horas. A descoberta desse efeito permitiu questionar se as MICs poderiam influenciar no crescimento das células. Realizou-se, então, a cultura das células Jurkat por 7 dias consecutivos, avaliando-se o efeito no crescimento dessas células. Os nossos dados mostram que após 7 dias de incubação as MICs foram capazes de reduzir o crescimento celular de maneira dose dependente. Em seguida, foi determinado se o estímulo por 1 hora com diferentes concentrações de rMIC1 e rMIC4 seguida da sua incubação seria suficiente para reduzir o crescimento das células em cultura. Nossos dados demonstram que após 1 hora de estímulo ocorre alteração de crescimento somente nas células que foram estimuladas com concentrações superiores a 10µg/mL.

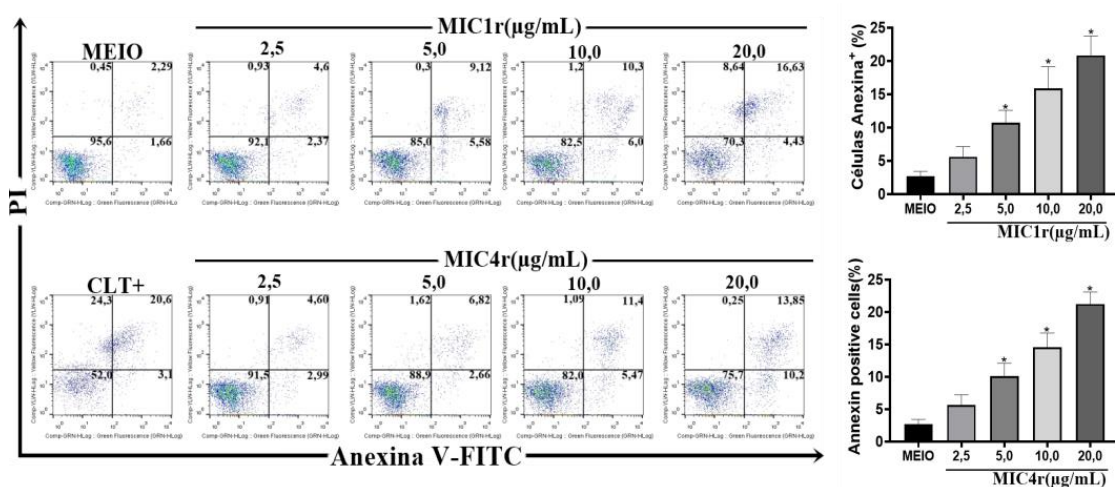


**Figura 10:** Figura: MIC1r e MIC4r afeta o crescimento das células Jurkat quando incubadas por tempos prologados. Culturas de células Jurkat na concentração de  $3 \times 10^4$  células/mL foram estimuladas por 7 dias consecutivos em presença de concentrações diferentes de MIC1r (A) ou MIC4r (B). Em alguns experimentos, as células foram estimuladas por apenas 1 hora com as lectinas, seguido de centrifugação e ressuspensão com um novo meio de cultura, sendo plaqueadas e crescidas por 7 dias consecutivos. A percentagem de crescimento foi obtida pela leitura de absorbância em 570nm do lisado celular, onde se acumula formazan como produto da redução de MTT. Resultados são expressos como Média ± Desvio Padrão e são representativos de dois experimentos independentes. \*P<0,05 em relação ao grupo de células que não foram lavadas com PBS.

### MICs aumentam a população de células anexina positivas

Grande parte dos efeitos observados na estimulação de lectinas em células leucêmicas é especulado como sendo o resultado da ligação cruzada e da estimulação de

vários receptores celulares. Esses efeitos são decorrentes da ativação de várias cascatas de sinalização, o que resulta em proliferação ou morte celular (BENOIST *et al.*, 2009; BLASCO *et al.*, 1995). Ao se estimular as células Jurkat com MIC1r ou MIC4r, nota-se que concentrações crescentes das lectinas acarretam no aumento de proporção de células positivas para marcação de anexina V da linhagem Jurkat, ou seja, possivelmente essas células que estavam em processo de apoptose (Figura 11).

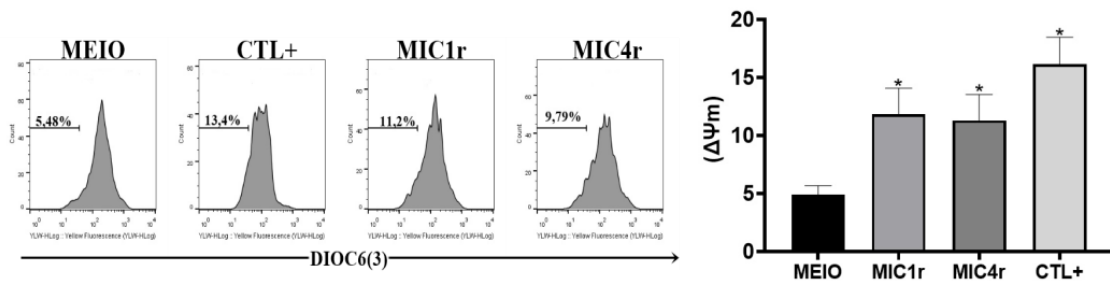


**Figura 11: MIC1r e rMIC4r aumentam a população de células apoptóticas em células de linhagem linfóide.** Células da linhagem Jurkat na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/mL foram estimuladas por 24 horas com diferentes concentrações de MIC1r ou rMIC4r. Após a incubação as células foram marcadas com anexina V e PI. Resultados expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão e são representativos de três experimentos. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  em relação ao controle (meio).

### MICs causam redução do potencial mitocondrial e fragmentação de cromatina

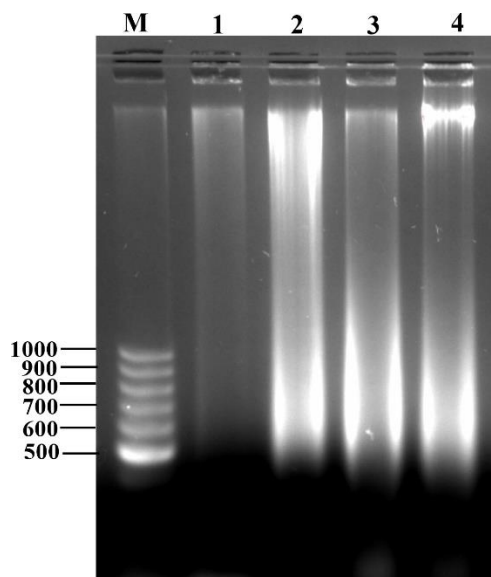
Esse resultado permitiu que se investigasse se de fato essas MICs induziam morte celular das células Jurkat. Desde que a perda do potencial de membrana mitocondrial é uma das características da apoptose, utilizou-se o marcador DIOC<sub>6(3)</sub>, que em função da sua característica catiônica fica retido dentro das mitocôndrias de células que não estão em processo de morte celular. Após 24 horas de estimulação das células Jurkat com MIC1r ou MIC4r, foi possível mostrar que essas proteínas diminuem a retenção de DIOC<sub>6(3)</sub> nessas células, ou seja, há redução do potencial mitocondrial possibilitando que as células entrem em apoptose (Figura 12).





**Figura 13: MIC1r e MIC4r reduzem o potencial mitocondrial das células Jurkat.** Culturas de células Jurkat na densidade de  $3 \times 10^5$  células/mL foram estimuladas com diferentes concentrações de MIC1r ou MIC4r. Após 24 horas de estímulo, as células foram incubadas com uma solução de DIOC<sub>6</sub> a 50nM, por 10 minutos. Após a marcação, as células foram lavadas em PBS aquecido a 37°C e centrifugadas, por 10 minutos, a  $300 \times g$ . As células foram adquiridas no citômetro Guava EasyCyte Mini System e os resultados foram analisados com o auxílio do programa FlowJow. O número indicado em cada histograma representa a quantidade de redução da marcação de DIOC<sub>6(3)</sub> ocorrida após estímulo com PBS (controle negativo - meio), MIC1r, MIC4r e As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (controle positivo - CTL+).

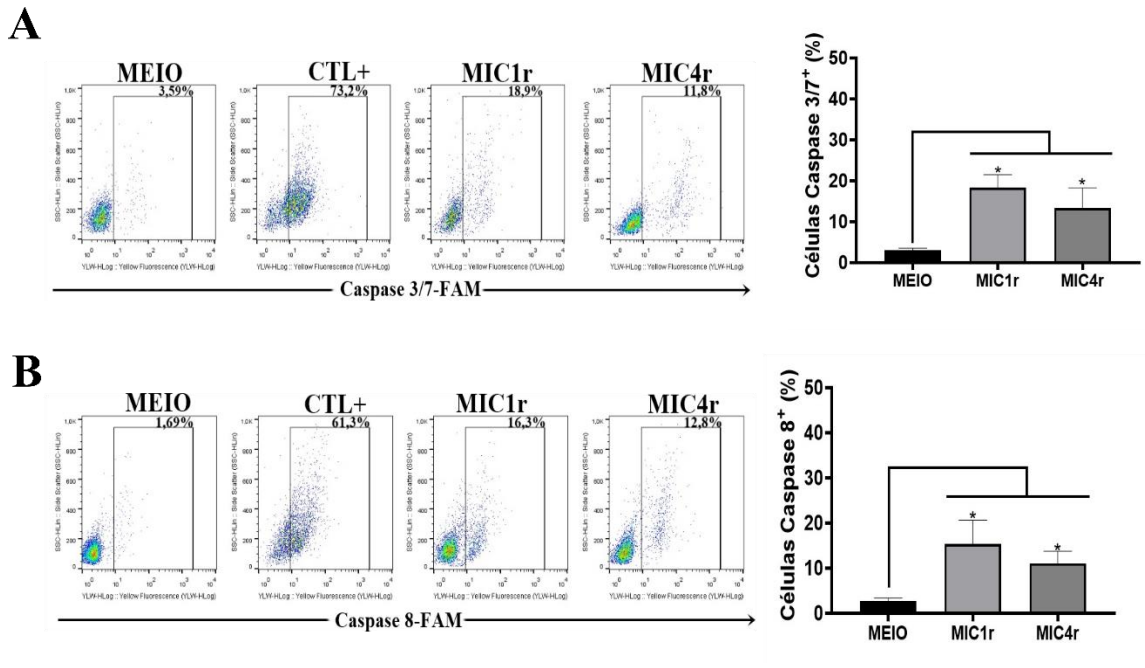
Durante a morte celular por apoptose ocorre a clivagem de várias proteínas e isso acarreta na clivagem de DNA com tamanho menor que 500pb. Nossos dados demonstram que após 24 horas de estímulo, as MIC1r e MIC4r causaram a fragmentação de DNA (Figura 13). Em conjunto, nossos dados sugerem que MIC1r e MIC4r causam apoptose em células Jurkat.



**Figura 13: Linhagem leucêmica Jurkat sofre fragmentação de cromatina após estímulo por 16 horas com MIC1r ou MIC4r.** Culturas de células Jurkat na densidade  $5 \times 10^5$  células/mL foram estimuladas com  $5 \mu\text{g/mL}$  de MIC1r (2) ou MIC4r (3). Em seguida, as células foram lisadas e tiveram o DNA genômico extraído. O produto da extração foi analisado em SDS-PAGE a 1,5%. M = marcador de tamanho molecular de 1kpb, 1 = controle negativo (células não estimuladas) e 4 = controle positivo (fragmentação de cromatina- células estimuladas com  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{As}_2\text{O}_3$ ).

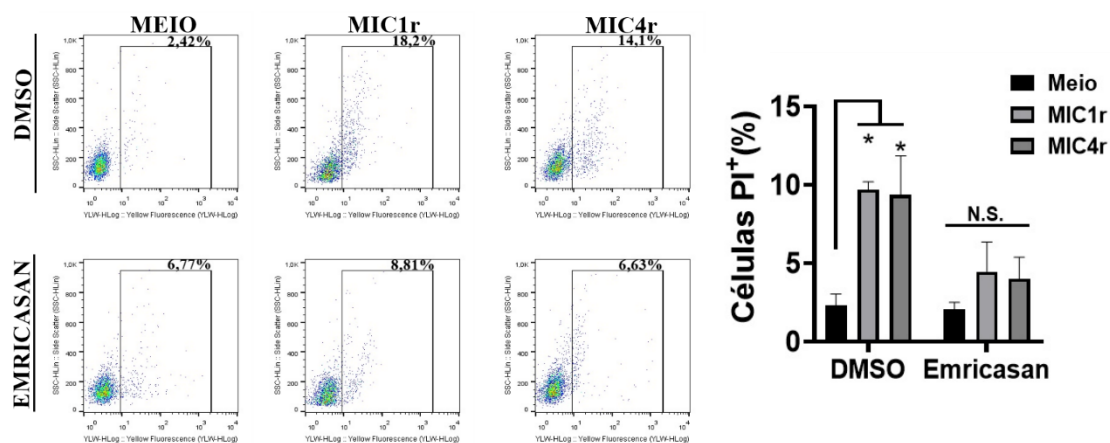
### MICs causam morte células na dependência da ativação de caspases

Apoptose é um processo coordenado que pode ser ativado por meio de duas vias (GREEN, 2019). A via intrínseca caracterizada pela liberação do conteúdo mitocondrial no citoplasma que por sua vez ativa a formação de um complexo multiproteico que culmina na ativação de caspase 9 (ELMORE, 2007) e a via extrínseca é causada por meio da ativação dos receptores de morte localizados na superfície das células que acarreta na ativação da caspase 8 (TUMMERS *et al.*, 2017). Essas vias convergem na ativação das capazes executoras, caspase 3 e 7. A fim de se investigar qual via seria ativada após incubação das células Jurkat com MIC1r e MIC4r, realizou-se a marcação de caspases 3/7 e caspase-8. Conforme pode ser visto na figura 14, MIC1 e MIC4 causam aumento da população de células positivas para as caspases 3/7. Em seguida, realizou-se a marcação de caspase-8, o que poderia dar um direcionamento da descoberta do possível mecanismo de morte causado pelas MICs. Os nossos dados demonstraram que as MICs aumentam a proporção de células caspase-8 positivas 24 horas após o estímulo (Figura 14). O papel das caspases na morte em células Jurkat induzida por MIC1r e MIC4r ficou ainda mais evidente quando essas células foram tratadas com inibidor pan-caspases (Emricasan), o que aboliu a morte dessas células (Figura 15).



**Figura 14: rMIC1 e rMIC4 induz aumento da população de células positivas para caspase 3/7/8 após 24 horas de estímulo.** Culturas de células Jurkat na densidade  $2,5 \times 10^5$  células/mL foram estimuladas com  $5 \mu\text{g/mL}$  de rMIC1 ou rMIC4, por 24 horas. Após o estímulo, as células foram marcadas com as sondas específicas para caspases 3/7 ou caspase-8, por 1 hora. As células foram lavadas com PBS e adquiridas em citômetro Guava EasyCyte Mini e os dados foram analisados com auxílio do programa FlowJow. Resultados são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão e são representativos de três experimentos. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$  em relação ao controle (meio).

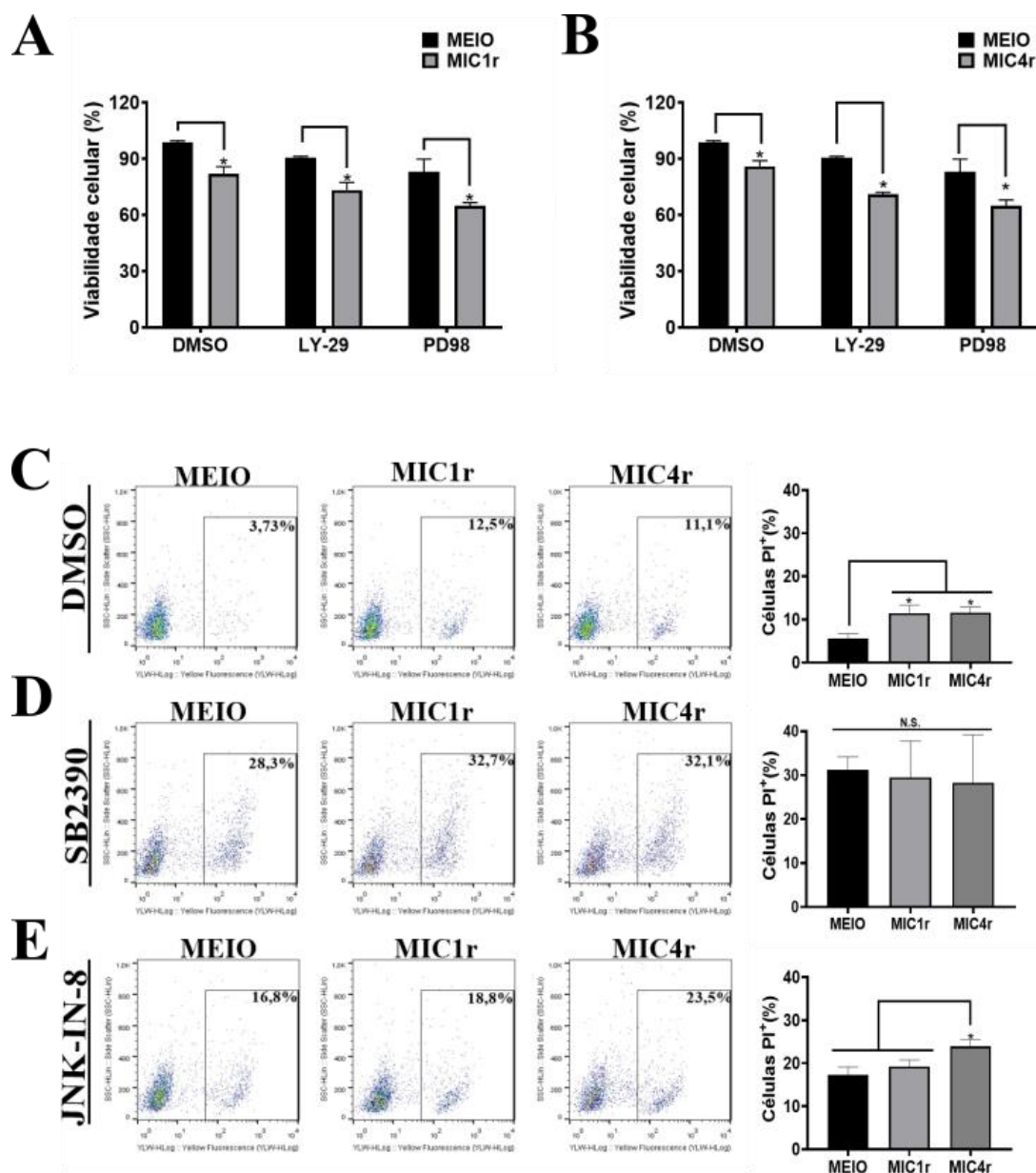
O papel das caspases na morte em células Jurkat induzida por MIC1r e MIC4r ficou ainda mais evidente quando essas células foram tratadas com inibidor pan-caspases (Emricasan), o que aboliu a morte dessas células (Figura 15).



**Figura 15: Incubação com o inibidor pan-caspase Emricasan reverte o efeito citotóxicos de rMIC1 e rMIC4.** Cultivos celulares foram estimuladas com rMIC1 ou rMIC4, conforme descrito na legenda da figura 14. As culturas testes foram feitas na presença de 15µM de Emricasan. Para o controle negativo do inibidor, utilizou-se DMSO. Após o estímulo, as células foram marcadas PI por 1 hora. As células foram lavadas com PBS e adquiridas em citômetro Guava EasyCyte Mini e os dados foram analisados com auxílio do programa FlowJow. Resultados são expressos como Média ± Desvio Padrão e são representativos de três experimentos. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. \*P<0,05 em relação ao controle não estimulado com MIC1r ou MIC4r.

### MAPK parecem estar envolvidas na morte celular causada pelas MICs

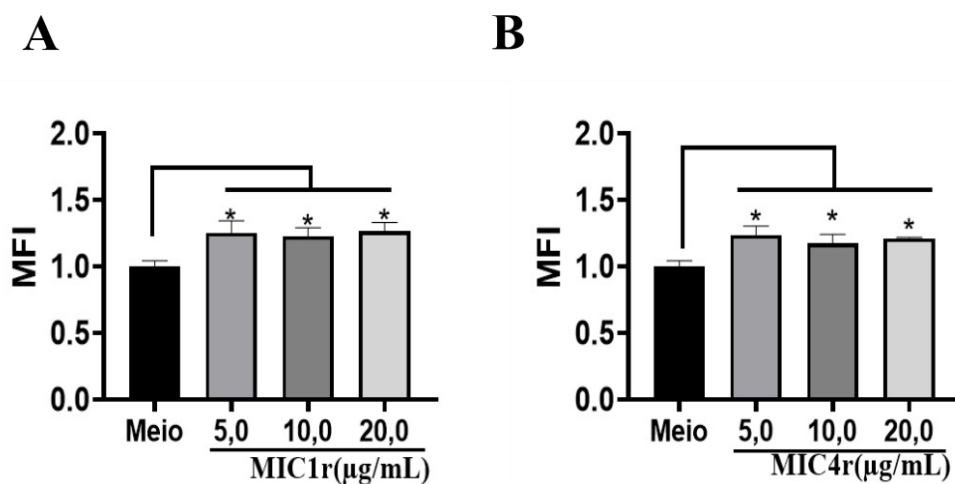
As células respondem ao estresse celular de diversas maneiras e a ativação de MAPKs é uma das formas com as células respondem aos estímulos agressivos. As MAPKs têm sido correlacionadas com a sobrevivência e morte celular em diversos modelos. Assim, foi investigado se haveria reversão da morte de células Jurkat tratadas com MIC1r e MIC4r após inibição de ERK, p38, PI3K e JNK com inibidores farmacológicos PD98, SB20, LY-29 e SP60, respectivamente. Aparentemente, MIC1r e MIC4r ativam vias diferentes durante a morte celular. MIC1r causa efeito citotóxico na dependência de JNK e p38, enquanto MIC4r está envolvida na ativação da via envolvendo a MAPK p38, haja vista que a viabilidade celular foi preservada na quando as células foram estimuladas em presença dos inibidores de JNK-IN-8 e SB2390 para MIC1r e SB2390 para MIC4r (Figura 16D e 16E). Não houve inibição da perda de viabilidade quando os inibidores da via de ERK foi utilizado, indicando que esta via é dispensável para sinalização de morte causada pelas MICs (Figura 16A e 16B). Além disso, nenhuma das lectinas parece induzir autofagia, o que é corroborado pelo não reversão dos efeitos citotóxicos ocasionados após inibição das vias envolvendo PI3K.



**Figura 16: Avaliação da inibição das possíveis vias de sinalização envolvidas na perda de viabilidade da linhagem de linfócitos T humanos.** Suspensões celulares da linhagem Jurkat na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/mL foram incubadas com os inibidores JNK-IN-8 ( $3\mu\text{M}$ ), SB2390 ( $10\mu\text{M}$ ), PD98 ( $5\mu\text{M}$ ) e LY-29 ( $2\mu\text{M}$ ) por 1 hora. Em seguida, as células foram estimuladas com  $5,0\mu\text{g/mL}$  das lectinas MIC1r (A) ou MIC4r (B), por 24 horas. A percentagem de viabilidade foi obtida pela leitura de absorvância em 570nm do lisado celular, onde se acumula formazan como produto da redução de MTT. Nos experimentos C-E após o estímulo de 24 horas, as células foram marcadas com  $5\mu\text{g/mL}$  de PI por 1 hora. As células foram lavadas com PBS e adquiridas em citômetro Guava EasyCyte Mini e os dados foram analisados com auxílio do programa FlowJow. Resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão e são representativos de três experimentos. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$  em relação ao controle não estímulo com MIC1r ou MIC4r.

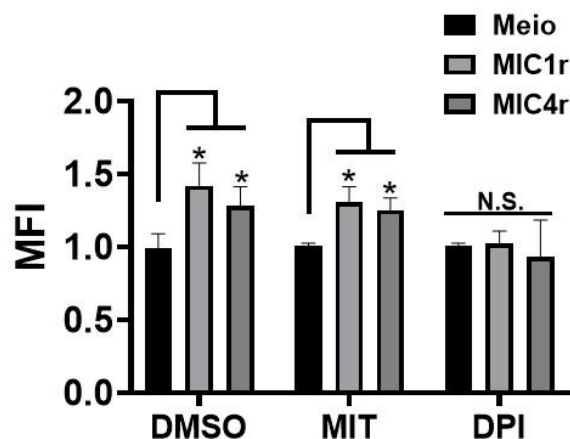
## MICs aumentam a produção de ROS na dependência do complexo NADPH oxidase

MAPK p38 e JNK estão envolvidas com a resposta celular ao estresse. Na literatura tem sido demonstrado que após incubação de com diferentes lectinas ocorre a produção de ROS. Não existem dados na literatura sobre o aumento da produção ROS após cultura com proteínas de micronemas de *T. gondii*. Dessa forma, avaliou-se o efeito em linhagem linfocítica Jurkat após estímulo com rMIC1 ou rMIC4 em relação à produção de ROS. Nossos dados indicam que após 2 horas de estímulo com MIC1 ou MIC4 ocorreu um aumento na detecção de ROS (Figura 17).



**Figura 17: MIC1r e MIC4r induzem a liberação de ROS em células linfocíticas humanas.** Suspensões de linfócitos humanos na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/mL foram marcadas por 45 minutos com  $5 \mu\text{M}$  de DFCDA. Em seguida, as células foram estimuladas ou não com diferentes concentrações de rMIC1 (A) ou rMIC4 (B). As placas foram lidas no leitor de placas Bio-Tek FLX800. Resultados expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão e são representativos de três experimentos. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$  em relação ao controle (meio).

Em seguida, avaliou-se a fonte da produção de ROS, utilizando-se um inibidor do complexo NADPH oxidase (DPI) e a utilização de um agente redutor, o qual é preferencialmente sequestrado dentro das mitocôndrias (MIT). Nossos dados sugerem que apenas o inibidor de NADPH oxidase foi capaz de bloquear a liberação de ROS (Figura 18).

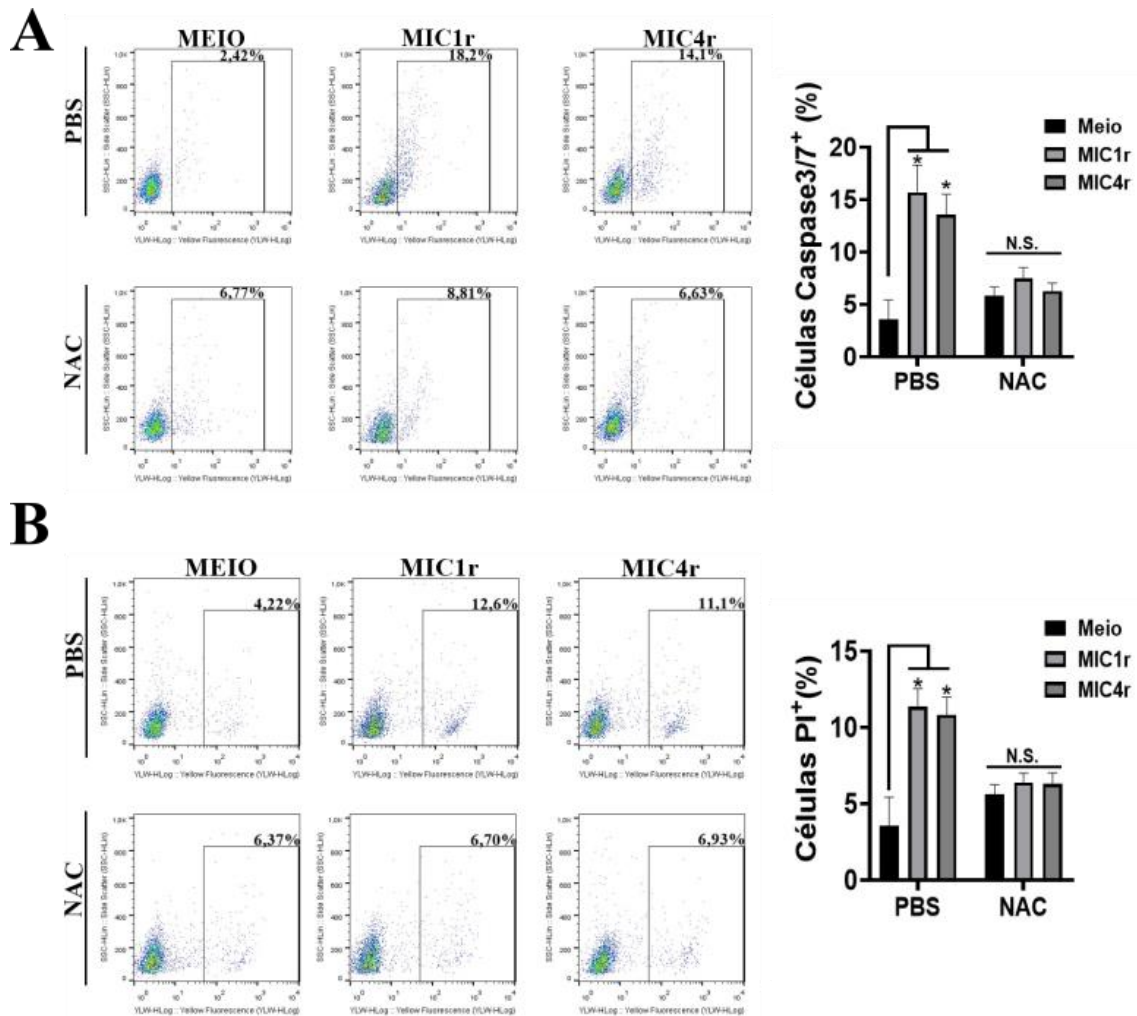


**Figura 18: Produção de ROS induzida por MIC1r e MIC4r parece dependente do complexo NADPH oxidase.** Cultivos celulares da linhagem Jurkat na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/mL foram marcadas com DFCDA e estimuladas com  $5 \mu\text{g/mL}$  de rMIC1 ou rMIC4. Nos grupos onde se buscou descobrir a fonte da produção de ROS, adicionou-se os inibidores DPI ( $20 \mu\text{M}$ ) e MIT ( $20 \mu\text{M}$ ), 1 hora antes do estímulo com rMIC1 ou rMIC4. Após 2 horas, as placas foram lidas leitor de microplacas Bio-Tek FLX800. Resultados expressos em Média  $\pm$  Desvio Padrão e são representativos de três experimentos. A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. \* $P < 0,05$  em relação ao controle não estimulado com MIC1r ou MIC4r.

### Efeito citotóxico das MICs é revertido em presença do agente redutor NAC

Em seguida, foi avaliado se a adição NAC, um inativador de ROS, reduziria o efeito de morte causado por MIC1r e MIC4r, por meio da redução da população de células caspase3/7 e PI positivas. Nossos dados mostram que o estímulo das MICs com o agente redutores revertem o aumento tanto de células caspases 3/7<sup>+</sup> quanto células PI<sup>+</sup>. Em conjunto, estes dados sugerem que a produção de ROS acarreta na ativação de caspases levando as células T humanas a sofrerem apoptose.





**Figura 19: rMIC1 e MIC4r aumentam a marcação das caspases 3/7 e caspase-8 nas células Jurkat na dependência de ROS.** Cultivos celulares da linhagem Jurkat foram estimulados com 5µg/mL de MIC1r ou MIC4r, por 24 horas. Após o estímulo, as células foram marcadas com as sondas específicas para caspases 3/7, caspase-8 ou PI. Após lavagem com PBS, as células foram adquiridas no citômetro Guava EasyCyte Mini System. A análise foi feita com o auxílio do programa FlowJow. \*P<0,05 em comparação as células não estimuladas.



# Discussão

## 5. Discussão

No presente estudo, investigou-se a interação das proteínas de micronema de *T. gondii* MIC1 e MIC4 recombinantes com glicanas de superfície de células linfocíticas humanas, representada pela linhagem de células T Jurkat. Descobriu-se que temperatura e concentração influenciam na ligação dessas proteínas micronêmicas com glicanas de superfície das células Jurkat e que essas interações induzem a perda de viabilidade das células Jurkat por meio da indução de apoptose.

*T. gondii* é um parasito extracelular obrigatório com capacidade de infectar células nucleadas de praticamente todos os animais homeotermos. Dentre os principais requisitos para invasão celular feito por *T. gondii* está a secreção de modo sincronizado de proteínas de roptrias, micronemas e grânulos densos, que são organelas peculiares de protistas do filo Apicomplexa ao qual *T. gondii* pertence (VENUGOPAL *et al.*, 2018). Nosso grupo tem estudado proteínas de micronema de *T. gondii* MIC1 e MIC4, as quais são liberadas nas primeiras etapas da invasão das células hospedeira, fornecendo uma interação mais forte entre o parasito e a célula hospedeira. Outro requisito essencial para o processo de infecção é a temperatura, sendo que mínima descrita para invasão celular por *T. gondii* parece ser de 27°C enquanto para a replicação necessita-se de no mínimo 30°C (YANG, *et al.*, 2020). Atualmente, não é conhecido porque há necessidade de uma temperatura mínima necessária para a invasão e proliferação do *T. gondii*, mas há uma possibilidade de que certas proteínas usadas nesses processos precisam de determinada temperatura para sua atividade ótima. Dessa forma, inicialmente, neste trabalho, foi investigado se a temperatura poderia influenciar no reconhecimento de receptores glicosilados em células linfocíticas. Os nossos resultados sugerem que na temperatura de 37°C parece favorecer a interação de MIC1 e MIC4 com receptores glicosilados, enquanto a ligação é menor em temperaturas mais baixas, tais como 4° e 25°C. Além do estudo de Yang *e cols.* (2020) sobre temperatura mínima para infecção por *T. gondii*, Carruthers *e cols.* (1999) mostraram que a secreção dos conteúdo micronêmico era completamente inibida em temperaturas inferiores a 25°C e tinham menor liberação desse conteúdo em temperaturas inferiores a 37°C. Dentre as proteínas cuja secreção no meio extracelular estava diminuída, destacam-se MIC2, MIC1 e MIC4. Outras organelas pareciam não sofrer tanto em temperaturas abaixo de 37°C (CARRUTHERS *et al.*, 1999). Estes resultados nos permitem inferir o efeito direto da temperatura na capacidade de

reconhecimento das proteínas de micronema de *T. gondii*, os nossos dados mostram que MIC1 e MIC4 sofrem influência da temperatura na interação com glicoproteínas. É possível sugerir que em baixas temperaturas essas MICs não possuem um enovelamento ótimo e que com isso impacta diretamente na sua liberação no meio extracelular causando a sua retenção no interior da célula do parasito.

No presente estudo, investigou-se a interação das proteínas de micronema de *T. gondii* MIC1 e MIC4 recombinantes com glicanas de superfície de células linfocíticas humanas, representada pela linhagem de células T Jurkat. Descobriu-se que temperatura e concentração influenciam na ligação dessas proteínas micronêmicas com glicanas de superfície das células Jurkat e que essas interações induzem a perda de viabilidade das células Jurkat por meio da indução de apoptose.

As propriedades lectínicas de MIC1 e MIC4 é algo bastante conhecido, tornando-se tal característica um alvo principal para nossa busca por informações de como MIC1 e MIC4 interagem com a superfície das células linfoides (LOURENÇO *et al.*, 2001). MIC1 é uma lectina que se liga à glicanas contendo ácidos siálicos terminal enquanto MIC4 liga-se àquelas contendo  $\beta$ -galactosídeo terminal (MARCHANT *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2021). Para os ensaios de ligação a carboidratos, optou-se por duas proteínas altamente glicosiladas - fetuína e, sua contraparte dessialilada, assialofetuína. Fetuína pode ser usada em ensaios de ligação de MIC1 por ser rica em ácido siálico terminal e assialofetuína para MIC4, desde que essa glicofoma de fetuína, por não ter ácido siálico, é rica em  $\beta$ -galactosídeo terminal (ČERNOCKÁ *et al.*, 2021). A dependência da interação proteína-carboidrato na ligação de MIC1 e MIC4 à superfície das células Jurkat foi bastante evidente, uma vez que fetuína e assialofetuína inibiram tais ligações, respectivamente. Uma significativa diminuição dessas interações também foi vista quando células Jurkat foram dessialiladas com neuraminidase e incubadas com MIC1, ou quando foram tratadas com  $\beta$ -galactosidase e incubadas com MIC4. Corroborando essa ideia, mostrou-se que a coincubação de MIC4 com fetuína não interferia com a ligação dessa lectina as células Jurkat, e de forma semelhante a assialofetuína não competiu para a ligação de MIC1 com células Jurkat.

Um dado importante descoberto nesse trabalho foi o efeito que MIC4r reduz a interação entre MIC1r marcada e células Jurkat, vale ressaltar que o contrário não ocorreu, ou seja, MIC1 não interferiu na ligação de MIC4r marcada às células Jurkat. Esse efeito pode ter ocorrido em função do maior tamanho molecular de MIC4r, cerca de 60kDa, quando comparado com a lectina MIC1r, que tem 49kDa. Assim, é possível que MIC4 e

MIC1 competem por sítios de glicosilação próximos, mas não no mesmo resíduo de asparagina glicosilado, e MIC4 por possuir um maior tamanho molecular impeça interação de MIC1r por meio do bloqueio estérico. Essa hipótese é corroborada pela análise de *GLycoarray* onde ficou demonstrado que MIC4 interage com glicanas terminais contendo  $\beta$ 1-3 e  $\beta$ 1-4 galactosamina, mas não em resíduos que contenham ácido siálico terminal (FRIEDRICH *et al.*, 2010; MARCHANT *et al.*, 2012; SARDINHA-SILVA *et al.*, 2019). Reforçando esta hipótese, nossos dados sugerem que a digestão de glicanas com neuraminidase presentes em receptores na superfície das células não ocasionou no aumento do reconhecimento de MIC4. Sendo assim é possível que MIC1 e MIC4 interagem com resíduos de asparagina glicosilados próximos mas não no mesmo sítio de glicosilação.

Diversos trabalhos na literatura tem demonstrado que lectinas podem exercer efeitos citotóxicos em células de linhagens (SINGH *et al.*, 2016; TATSUTA *et al.*, 2013). O reduzido número de trabalhos na literatura descrevendo efeitos citotóxico de lectinas de patógenos em células de linhagem nos fez investigar se MIC1 e MIC4 também causariam morte celular nesse tipo de célula. Os nossos dados demonstram que MIC1r e MIC4r causam perda da viabilidade nas células Jurkat e que este efeito é mais pronunciado quanto maior o tempo de estímulo das células em cultura. Além disso, os resultados sugerem que estes efeitos ocorrem de maneira dependente do reconhecimento de carboidratos, uma vez que os tais efeitos citotóxicos desencadeados por essas MICs podem ser revertidos com adição de glicoproteínas que inibem as atividades biológicas dessas lectinas. A concentração de glicoproteínas necessárias para bloquear o efeito tóxico de MIC1 e MIC4 foi maior para fetuína do que para assialofetuína. Este efeito também foi observado com outras lectinas e parece depender do efeito de morte combinado com a restrição de crescimento das células utilizadas nos estudos. Corroborando esses achados se encontra a lectina POL possui o efeito de aumentar a perda de viabilidade conforme é aumentado o tempo de exposição em cultura com a linhagem L929 murina (LIU *et al.*, 2009). Apesar de MIC1r e MIC4r aparentemente competirem pela ligação à superfície das células Jurkat, com MIC4r interferindo com a ligação de MIC1r, observou-se que essas moléculas causam efeitos aditivos sobre a viabilidade celular quando incubadas na mesma cultura. É possível que as MICs interajam com diferentes tipos de receptores e/ou ativam diferentes vias de morte celular o que explica o efeito de morte ser aumentado quando as duas lectinas são adicionadas na cultura da linhagem de linfócitos humanos.

Para avaliar se os efeitos citotóxicos de MIC1r e MIC4r eram restritos a linhagem de linfócitos humanos, investigou-se os efeitos dessas lectinas duas linhagens monocíticas humanas THP1 e U937. Os resultados mostraram que apenas as células U937 parecem ser sensíveis aos efeitos dessas MICs. É possível inferir que os mecanismos de sobrevivência das células THP1 sejam mais efetivos quando comparado com as células U937. Além disso, é possível sugerir que o aumento ou expressão de diferentes receptores de morte podem ser responsáveis pela susceptibilidade ou não de determinadas linhagens a diferentes tipos de lectinas. Resultados similares tem sido reportado com outras lectinas. A lectina WGA tem se mostrado tóxica para células da linhagem HL-60 e U937, entretanto, o mesmo efeito não foi observado em células HEK 293 (WANG *et al.*, 2000).

Na tentativa de se descobrir os principais mecanismos envolvidos na perda de viabilidade das células Jurkat incubadas com MIC1r e MIC4r, avaliou-se a marcação dessas células com com anexina/PI, a ativação de caspases com sondas específicas, a fragmentação de cromatina por meio da eletroforese em gel de agarose e o potencial mitocondrial pela retenção do marcador DIOC6<sub>(3)</sub>. Inicialmente, observou-se que as células Jurkat estimuladas com MIC1r e MIC4r aumentam a expressão de ligantes de anexina V, característica de célula em processo de apoptose. Nesse processo, a ativação de caspases acarreta na clivagem de diversos substratos que são responsáveis pela morfologia das células apoptóticas. Dentre as proteínas clivadas se encontra o inibidor de DNase ativado por caspase (ICAD), que após a sua clivagem permite que nucleases sejam encaminhadas ao núcleo e possam digerir o DNA em pequenos fragmentos (ENARI *et al.*, 1998). De fato, nossos resultados de eletroforese demonstram que MIC1 e MIC4 induzem maior fragmentação de DNA quando comparado com as células não estimuladas. Assim, nossos resultados sugerem que células Jurkat estimuladas com MIC1r ou MIC4r entram em apoptose.

A via extrínseca ocorre por meio da interação de ligantes extracelulares com receptores na superfície celular, esses receptores são chamados de receptores de morte. Os ligantes pertencem à grande família do fator de necrose tumoral, e os seus receptores são membros da família dos receptes de TNF. Os principais receptores de morte são o receptor de fator de necrose tumoral 1(TNF-R1), FAS ou CD95, receptores de TRAIL (TUMMERS *et al.*, 2017). Após a ligação do ligante, os receptores sofrem mudanças estruturais que expõem domínios de morte (do inglês death domains). Esses domínios de morte interagem com uma proteína adaptadora por meio de interação homotípica. No caso dos receptores TRAIL e CD95 essa proteína adaptadora é FADD (NAGATA, 2018).

Caspase 8 é recrutada para o complexo formado por FADD por meio da interação com o domínio DED. Caspase 8 é ativada por autoclivagem. O complexo formado por caspase 8, FADD e CD95 é conhecido como complexo de sinalização indutor de morte (DISC). A caspase 8 ativada é capaz de clivar as caspases executoras 3 e 7 (GREEN, 2022b).

Proteínas pró-apoptóticas interagem com a membrana externa da mitocôndria e acarretam na formação de poros (TAIT *et al.*, 2010). Dentre essas proteínas, destaca-se BID, uma proteína da família de pró-caspase Bcl-2, que é clivada por caspase 8. Quando clivada, BID interage e cliva as proteínas BAX e BAK, as quais medeiam permeabilização da membrana externa mitocondrial. Assim, o citocromo c é liberado dessas mitocôncrias e no citosol interage com domínios WD40 do fator ativador de protease apoptótica-1 (Apaf-1), possibilitando a montagem do apoptossomo, que inicia uma cascata de clivagem de caspases executoras da morte celular de uma forma orquestrada (NAGATA, 2018). Para avaliar se esse processo poderia estar ocorrendo nas células Jurkat estimuladas por MIC1r e MIC4r, utilizou-se DIOC6<sub>(3)</sub>, um corante lipofílico fluorescente verde, que é seletivo para as mitocôndrias de células vivas. Caso haja a formação de poros na membrana externa da mitocôndria, há a liberação do corante DIOC6<sub>(3)</sub>, o que leva a menor marcação das mitocôndrias, tornando a célula menos fluorescentes. Os resultados aqui descritos mostram que após o estímulo com MIC1r e MIC4r ocorre uma redução significativa da marcação de DIOC6<sub>(3)</sub>. Tomados juntos, nossos resultados mostram que ambas lectinas parecem ativar a via extrínseca e intrínseca da apoptose.

Um dos desafios de se trabalhar com lectina tem sido a sua capacidade de interagir com diferentes receptores e causar diferentes tipos de efeitos conforme a linhagem celular utilizada no estudo (BHUTIA *et al.*, 2019). No nosso estudo demonstramos que MIC1 e MIC4 aumentam a porcentagem de células caspase 3/7 e caspase 8 após 24 horas de estímulo. Além disso, nossos dados indicam que este efeito é dependente da ativação de MAPK e liberação de ROS na dependência do complexo NADPH oxidase.

O complexo NADPH oxidase é exposto na superfície celular e é capaz de interagir com diferentes receptores auxiliando participando na sinalização de diferentes receptores. Receptores da família do TNF são responsáveis pela ativação da via extrínseca. Diversos trabalhos tem demonstrado que o complexo NADPH oxidase é capaz de interagir com duas proteínas adaptadoras fundamentais na sinalização da via extrínseca. Uma das proteínas é TRADD (TNFR associated death domain protein) que medeia a sinalização

do receptor de TNF do tipo 1, e o outro receptor é o FAS onde complexo produtor de ROS interage com a proteína FADD (Fas Associated Via Death Domain). Além disso, a interação entre o complexo NADPH oxidase tem sido implicado na ativação de diferentes MAPK.

A ativação de p38 e JNK tem sido implicada pela morte celular por meio de pelo menos três mecanismos diferentes (DHANASEKARAN *et al.*, 2008; YUE *et al.*, 2020). JNK pode aumentar a expressão de receptores envolvidos com morte celular TNFR1, FAS (FAN *et al.*, 2001). Além disso, JNK tem sido envolvido no aumento da transcrição de proteínas pró-apoptóticas e ou redução de proteínas anti-apoptóticas (DHANASEKARAN *et al.*, 2008). Outro mecanismo proposto para a atividade apoptogênica de JNK é por meio da ativação direta da via intrínseca da apoptose (MADESH *et al.*, 2002). Embora os mecanismos não estejam totalmente elucidados, tem sido reportado que JNK pode induzir a clivagem da proteína BID, independente de caspase 8, em um fragmento ativo de conhecido  $\gamma$ BID que causa a liberação da proteína SMAC/DIABLO do espaço intermembrana mitocondrial (DENG *et al.*, 2003). Outra forma de JNK ativar a via intrínseca é por meio da fosforilação da proteína BIM acarretando na sua liberação e levando a ativação de BAX e BAK causar morte celular (YUE *et al.*, 2020). Por outro lado p38 parece reduzir a acumulação de proteínas anti-apoptóticas BCL-xL e BCL-2 na mitocôndria reduzindo assim a sua atividade antiapoptótica (FARLEY *et al.*, 2006). Dessa forma MAPK podem participar de morte celular por meio de vários mecanismos.

# **Conclusões**



## 6. Conclusões

- Proteínas de micronema 1 e 4 de *T. gondii* interagem melhor com a linhagem Jurkat na temperatura de 37°C.
- Recombinantes MIC1 e MIC4 interagem com receptores glicosilados na dependência do reconhecimento de carboidratos.
- MIC4 parece exercer bloqueio estérico impedindo MIC1 de se ligar em receptores da superfície.
- MIC1 e MIC4 reduzem a viabilidade de linfócitos humanos na dependência do reconhecimento de carboidratos.
- MIC1 e MIC4 causam aumento da porcentagem de células anexina/PI positivas, redução do potencial mitocondrial e fragmentação de cromatina.
- MIC1 e MIC4 causam morte celular por meio da ativação de caspase3/7 e caspase 8 que é revertida por meio do tratamento com o inibidor de pan caspase Emricasan.
- MIC1 e MIC4 causa morte celular por meio da sinalização das MAPK JNK e p38 e produção de ROS por meio do complexo NADPH oxidase.

# Referências

## 7. Referências

BENOIST, H.; CULERRIER, R.; POIROUX, G.; SÉGUI, B. *et al.* Two structurally identical mannose-specific jacalin-related lectins display different effects on human T lymphocyte activation and cell death. **The Journal of Biological Chemistry**, 86, n. 1, p. 103-114, 2009.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. 64, n. 3, p. 607-623, 2000.

BLASCO, E.; BARRA, A.; NICOLAS, M.; LECRON, J.-C. *et al.* Proliferative response of human CD4+ T lymphocytes stimulated by the lectin jacalin. 25, n. 7, p. 2010-2018, 1995.

BÜSSING, A.; SUZART, K.; BERGMANN, J.; PFÜLLER, U. *et al.* Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins. **Cancer Letters**, 99, n. 1, p. 59-72, 1996.

CARRUTHERS, V. B.; GIDDINGS, O. K.; SIBLEY, L. D. Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. 1, n. 3, p. 225-235, 1999.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **Eur J Cell Biol**, 73, n. 2, p. 114-123, 1997.

CARRUTHERS, V. B.; TOMLEY, F. M. Microneme Proteins in Apicomplexans. *In*: BURLEIGH, B. A. e SOLDATI-FAVRE, D. (Ed.). **Molecular Mechanisms of Parasite Invasion: Subcellular Biochemistry**. New York, NY: Springer New York, 2008. p. 33-45.

DUBOIS, D. J.; SOLDATI-FAVRE, D. Biogenesis and secretion of micronemes in *Toxoplasma gondii*. 21, n. 5, p. e13018, 2019.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOYAMA, H.; OKAWA, K. *et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, 391, n. 6662, p. 43-50, 1998.

FOURMAUX, M. N.; ACHBAROU, A.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; BIDERRE, C. *et al.* The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 83, n. 2, p. 201-210, 1996.

FU, L.-l.; ZHOU, C.-c.; YAO, S.; YU, J.-y. *et al.* Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 43, n. 10, p. 1442-1449, 2011.

GREEN, D. R. The Coming Decade of Cell Death Research: Five Riddles. **Cell**, 177, n. 5, p. 1094-1107, 2019/05/16/ 2019.

GRIFFITHS, G. D.; LEEK, M. D.; GEE, D. J. The toxic plant proteins ricin and abrin induce apoptotic changes in mammalian lymphoid tissues and intestine. 151, n. 3, p. 221-229, 1987.

LIU, B.; ZHANG, B.; MIN, M.-w.; BIAN, H.-j. *et al.* Induction of apoptosis by Polygonatum odoratum lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1790, n. 8, p. 840-844, 2009.

LIU, Q.; LI, F.-C.; ZHOU, C.-X.; ZHU, X.-Q. Research advances in interactions related to Toxoplasma gondii microneme proteins. **Experimental Parasitology**, 176, p. 89-98, 2017.

MARCHANT, J.; COWPER, B.; LIU, Y.; LAI, L. *et al.* Galactose Recognition by the Apicomplexan Parasite Toxoplasma gondii. **The Journal of Biological Chemistry**, 287, n. 20, p. 16720-16733, 2012.

MUNIZ-FELICIANO, L.; VAN GROL, J.; PORTILLO, J.-A. C.; LIEW, L. *et al.* Toxoplasma gondii-Induced Activation of EGFR Prevents Autophagy Protein-Mediated Killing of the Parasite. **PLOS Pathogens**, 9, n. 12, p. e1003809, 2013.

NASCIMENTO, A. P. M.; WOLIN, I. A. V.; WELTER, P. G.; HEINRICH, I. A. *et al.* Lectin from Dioclea violacea induces autophagy in U87 glioma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, 134, p. 660-672, 2019/08/01/ 2019.

PARSHENKOV, A.; HENNET, T. Glycosylation-Dependent Induction of Programmed Cell Death in Murine Adenocarcinoma Cells. 13, 2022. Original Research.

REISS, M.; VIEBIG, N.; BRECHT, S.; FOURMAUX, M.-N. *et al.* Identification and Characterization of an Escorter for Two Secretory Adhesins in Toxoplasma gondii. **Journal of Cell Biology**, 152, n. 3, p. 563-578, 2001.

SARDINHA-SILVA, A.; MENDONÇA-NATIVIDADE, F. C.; PINZAN, C. F.; LOPES, C. D. *et al.* The lectin-specific activity of Toxoplasma gondii microneme proteins 1 and 4 binds Toll-like receptor 2 and 4 N-glycans to regulate innate immune priming. **PLOS Pathogens**, 15, n. 6, p. e1007871, 2019.

SHATNYEVA, O. M.; KUBARENKO, A. V.; WEBER, C. E. M.; PAPPA, A. *et al.* Modulation of the CD95-Induced Apoptosis: The Role of CD95 N-Glycosylation. **PLOS ONE**, 6, n. 5, p. e19927, 2011.

SHI, Z.; LI, W.-w.; TANG, Y.; CHENG, L.-j. A Novel Molecular Model of Plant Lectin-Induced Programmed Cell Death in Cancer. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 40, n. 10, p. 1625-1629, 2017.

SINGH, R.; NAWALE, L.; SARKAR, D.; SURESH, C. G. Two Chitotriose-Specific Lectins Show Anti-Angiogenesis, Induces Caspase-9-Mediated Apoptosis and Early Arrest of Pancreatic Tumor Cell Cycle. **PLOS ONE**, 11, n. 1, p. e0146110, 2016.

TATSUTA, T.; HOSONO, M.; SUGAWARA, S.; KARIYA, Y. *et al.* Sialic acid-binding lectin (leczyme) induces caspase-dependent apoptosis-mediated mitochondrial perturbation in Jurkat cells. **International journal of oncology**, 43, n. 5, p. 1402-1412, 2013.

TSANEVA, M.; VAN DAMME, E. J. M. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate Journal**, 37, n. 5, p. 533-551, 2020.

TUMMERS, B.; GREEN, D. R. Caspase-8: regulating life and death. 277, n. 1, p. 76-89, 2017.

WALCZAK, H. Death Receptor–Ligand Systems in Cancer, Cell Death, and Inflammation. 5, n. 5, 2013.

WANG, H.; NG, T. B.; OOI, V. E. C.; LIU, W. K. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 32, n. 3, p. 365-372, 2000.

WESSELBORG, S.; KABELITZ, D. Activation-Driven Death of Human T Cell Clones: Time Course Kinetics of the Induction of Cell Shrinkage, DNA Fragmentation, and Cell Death. **Cellular Immunology**, 148, n. 1, p. 234-241, 1993.

YANG, Y.; YU, S.-M.; CHEN, K.; HIDE, G. *et al.* Temperature is a key factor influencing the invasion and proliferation of *Toxoplasma gondii* in fish cells. **Experimental Parasitology**, 217, p. 107966, 2020.

ZHU, J.; WANG, Y.; CAO, Y.; SHEN, J. *et al.* Diverse Roles of TgMIC1/4/6 in the *Toxoplasma* Infection. 12, 2021. Review.

# **Anexos**

## **Anexos**

**Anexo 1: Recombinant microneme 1 and 4 from *Toxoplasma gondii* cause cytotoxic effects in human cells lines**

**Recombinant microneme 1 and 4 from *Toxoplasma gondii* cause cytotoxic effects in human cells lines**

Souza, I. E. L.<sup>1</sup>, Roque-Barreira, M.-C.<sup>1</sup>, Panunto-Castelo, A.<sup>2</sup>

1-Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

2. Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters at Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil.

### **Abstract**

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite that causes toxoplasmosis, a cosmopolitan zoonosis that has a high incidence worldwide. The disease can range from mild or asymptomatic in immunocompetent individuals to severe disease in immunodeficient patients or fetuses of mothers with acute toxoplasmosis. One of the most interesting characteristics of *T. gondii* is its ability to possibly infect all cells of homeothermic hosts. This invasion process is mediated by a series of molecules, including those secreted by specialized organelles - rhoptry, microneme, and dense granule. Such proteins help in the interaction between protozoan and host cells, the creation, and maintenance of the parasitophorous vacuole, and the egress of the parasite from the infected cell. Our group has studied two lectins secreted by micronemes, MIC1, and MIC4, which form a complex with the MIC6 protein. When the MIC1/MIC4/MIC6 complex is exposed on the parasite's plasma membrane, the MIC1 and MIC4 proteins recognize glycosylated receptors on the host cell, allowing a stronger interaction between the parasite and the host cell. The scarcity of studies involving the interaction between *T. gondii* and human lymphocytes led us to evaluate the effect of the recombinant proteins MIC1 and MIC4 on Jurkat human T lymphocyte cells. It was observed that these MICs interact better with Jurkat cells at 37°C, this binding being dependent on their carbohydrate recognition domains. Moreover, Jurkat cells stimulated with different concentrations of rMIC1 or rMIC4 result in the loss of viability of these cells. It is noteworthy that micronemal proteins increase caspase 3/7/8 positive population, and the cytotoxic effects triggered by these MICs are reversed after incubation with the pan-caspase inhibitor Emricasan. Additional data showed that the pathways used by these MICs to cause cell death in Jurkat cells depend on MAPK JNK and p38, intracellular signaling molecules involved in the cellular stress response. rMIC1r and rMIC4 induce stress signaling to cells, which can be observed by the release of ROS through the NADPH oxidase complex. Corroborating these data, it was discovered that the reducing agent NAC considerably reduced the marking of caspase3/7 and propidium iodide in groups stimulated with MIC1 or MIC4. Taken together, our data indicate that microneme proteins interact with receptors present in human lymphocytic cells in a manner dependent on carbohydrate recognition and cause cell death dependent on ROS release and MAPK activation.

Keywords: Microneme, Apoptosis, *Toxoplasma gondii*, Lectin

### **Introduction**



*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite belonging to the Phylum Apicomplexa that causes toxoplasmosis (DUBEY, 2020). Although the disease presents in the form of mild symptoms in most cases, in immunodeficient patients and fetuses, the parasite can cause severe disseminated disease resulting in death (HILL *et al.*, 2002). Infection in humans usually occurs after ingestion of food contaminated with cysts or oocysts (CARRUTHERS *et al.*, 2007). The parasite uses the contents of micronemes, rhoptry, and dense granules to facilitate the invasion, maintenance, and exit of the host cell (SCHWARTZMAN *et al.*, 1992).

Micronemes are rod-shaped secretory organelles that release their contents in the initial stages of parasite invasion of host cells (CARRUTHERS *et al.*, 1997a). Located in the anterior part of the parasite cell, micronemes have the function of releasing essential proteins that participate in the adhesion processes between the host cell and parasite, in the gliding movement, and during the egress of the parasite from the host cell (CARRUTHERS *et al.*, 2008). Most microneme proteins contain modular structures that are homologous to adhesion domains or binding domains present in higher eukaryotes such as epidermal growth factor-like domain (EGF-like), chitin-binding-like domain (chitin-like) and the repeated dominance of thrombospondin (LIU *et al.*, 2017). One of the proteins released by the microneme is MIC1, MIC4, and MIC6 which together are exposed in the cell parasite as complex (SOLDATI *et al.*, 2001). MIC1 and MIC4 are proteins that interact through their carbohydrate recognition domain (CRD) with sialyl and galactosyl terminals in glycoproteins, respectively (MARCHANT *et al.*, 2012; REISS *et al.*, 2001).

Lectins are proteins that have at least one non-catalytic site capable of irreversibly and specifically recognizing a mono- or polysaccharide. The carbohydrate-binding ability of this class of molecules is attributed to a polypeptide segment called the carbohydrate recognition domain (TSANEVA *et al.*, 2020). The first paper to demonstrate the ability of lectin to cause cell apoptosis was carried out by Griffiths and collaborators in 1993. In this study, it was demonstrated that cells of intestinal lymphoid tissues became apoptotic after intramuscular administration of ricin in rats (GRIFFITHS *et al.*, 1987). Later, two studies using mistletoe lectin and phytohemagglutinin showed a cytotoxic effect on T lymphocytes (BÜSSING *et al.*, 1996; WESSELBORG *et al.*, 1993). Recent studies have shown that in addition to apoptosis, lectins can participate in other types of cell death such as autophagy, necroptosis, and pyroptosis (PARSHENKOV *et al.*, 2022). The mechanism

by which lectin causes cell death is the binding of death receptors present on the surface of cells, blocking the binding of the ligand of growth factors to their receptors, destabilizing lysosomes leading to the release of their content in the cytoplasm, inhibiting protein synthesis and production of reactive oxygen species (ROS) (FU *et al.*, 2011).

In the present study, we evaluated how *T. gondii* micronemes lectins interact with glycans on the surface of human T lymphocyte lineage cells and mechanism of cell death caused by recombinant MIC1 and MIC4 from *T. gondii*. We found that rMIC1 interaction with Jurkat is affected by temperature, and concentration while rMIC4 is less sensitive to these parameters. Interestingly, we discovered rMIC4 modulates the affinity of rMIC1 to Jurkat cell receptors. Moreover, we that MICs cause apoptosis through the release of ROS and activation of MAPK.

## **Materials and methods**

### Cultivation of Jurkat U937 cells

U937 cells (ATCC: CRL-3253), THP1 (ATCC: TIB-202), and Jurkat E6 cells (ATCC: TIB-152) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 4.5g/L glucose (Sigma-Aldrich Aldrich, St. Louis, USA), 100U/ml of penicillin and 100µg/ml of streptomycin and 10% fetal bovine serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The culture medium was changed every 2 or 3 days. Only cell cultures with viability greater than 95% were used in the experiments.

### Evaluation of cell viability

Jurkat, cells at the density of  $2.5 \times 10^5$ /ml, was stimulated with different concentrations of rMIC1 or rMIC4 proteins for 24 hours. Four hours before the end of the experiment, 5µL of a 5 mg/mL MTT solution (Sigma-Aldrich) was added to each cell culture well. After the stimulation time, the plates were centrifuged at  $300 \times g$ , for 10 minutes, at room temperature. Culture supernatants were removed and 100µL of DMSO (Sigma-Aldrich) was added to each well. The plates were shaken protected from light for 10 minutes and then read at 570nm in a microplate reader (Power Wavex-BIOTEK).

In some experiments, an attempt was made to identify the mechanisms of cell death through the pharmacological inhibition of MAPKs (mitogen-activated protein

kinases). All inhibitors were purchased from Sigma-Aldrich, they are JNK-IN-8 a C-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor; SB239063, p38 MAPK inhibitor; and PD98059, ERK (extracellular signal regulated protein kinase) inhibitor. Other inhibitors involved in the autophagy pathway are: LY 294002 and Wortmannin, PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase). All inhibitors were incubated 1 hour before rMIC1 or rMIC4 challenge.

### Bind test

Cell suspensions of  $5 \times 10^5$  cells/ml of the Jurkat strain were fixed at room temperature with 4% paraformaldehyde in PBS. Then the cells were washed in PBS and ligation was performed with different concentrations of MIC1 or MIC4r under temperature conditions of 4°C, 25°C or 37°C. After 2 hours, the cells were washed and incubated with 5 µg/mL of Streptavidin-FITC for 40 minutes. After two consecutive washes with PBS, the cells were acquired in the Guava EasyCyte Mini System cytometer. In experiments where we sought to evaluate the effect of carbohydrate recognition, the glycoproteins - Fetuin and asialofetuin - were added at the same time as the biotinylated lectins. In the case of enzymatic treatment with neuraminidase (Sigma-Aldrich) the cells were left to digest at 37°C in acetate buffer pH=5.5 for one hour. The β-galactosidase enzyme (Sigma-Aldrich) was added to cells already added with citrate buffer pH=6.0. After digestion, the cells were washed and then marked with biotinylated lectins.

### Caspase Staining

To evaluate the increase in caspase 3/7 or caspase 8 marking, a suspension with  $2.0 \times 10^5$  cells/mL was stimulated with 5 µg/mL of MIC1r or MIC4r. As a positive control, 10 µg/mL of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and 15 µg/mL of Cycloheximide were used to mark caspase 3/7 and caspase 8, respectively. After 24 hours of stimulation, cells were labeled with FAM-Caspase 8 and FAM-Caspase 3/7 probes for 1 hour. After two washes, the cell suspensions were acquired in the Guava EasyCyte Mini System cytometer. The analysis was performed using the FlowJow V10 program.

### Assessment of mitochondrial potential

Jurkat cells at a density of  $2.5 \times 10^5$  cells/mL were stimulated with different concentrations of rMIC1 or rMIC4. After 24 hours of incubation, the DIOC6 probe was added to the suspension, with a final concentration of 50 nM. After 10 minutes, cells were

washed with PBS at 37°C, centrifuged at 300 × g and resuspended with RPMI medium. Then, the cells were collected and acquired in a FACS Canto flow cytometer (BD Bioscience). Sample analysis was performed using the FLOWJO program (BD Bioscience).

#### Annexin V and Propidium Iodide

Jurkat cells at a density of  $2.5 \times 10^5$  cells/mL were stimulated with different concentrations of rMIC1 or rMIC4. After 24 hours of incubation, the cells suspension was staining with kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Bioscience). Next, the cells were collected and acquired in a FACS Canto flow cytometer (BD Bioscience). Sample analysis was performed using the FLOWJO program (BD Bioscience).

#### Detection of reactive oxygen species

Jurkat cell lines, at a density of  $2.5 \times 10^5$  cells/mL, were labeled with the DFCDA probe, at a concentration of 0.1nM, for 45 minutes. After incubation, cells were centrifuged at 300 × g and resuspended in RPMI-c in the dark. Cells were plated and stimulated for 2 hours with different concentrations of rMIC1 or rMIC4. Then, the cells were acquired in a FACS Canto cytometer and analyzed using the FLOWJO program (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA). In experiments where inhibition of the NADPH oxidase complex was sought by (APOCY-Sigma Aldrich) or N-Acetyl-Cysteine (NAC) (Sigma-Aldrich), the blockade was performed concomitantly with incubation with DFCDA (Sigma-Aldrich).

#### Chromatin fragmentation analysis

Cell suspensions containing  $5 \times 10^5$  cells/ml of the human T lymphocyte lineage Jurkat were stimulated for 16 hours with 5µg/ml of rMIC1 or rMIC4. After this time, cells were collected and washed in ice-cold PBS. Then, the cells were centrifuged at 300 × g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was removed and the cells were disrupted with 200µL of lysis buffer (100mM NaCl, 20mM Tris, 10mM EDTA, 0.5 SDS and 1% Triton X-100, pH 8.0). Then, 1µg/mL of RNase (Sigma-Aldrich) was added and the cell lysate

was left in a dry bath for 1 hour. Then, 10µg/mL of proteinase K (Thermo Fisher Scientific) was added, and the samples were incubated for 16 hours at 56°C. After that time, the lysate was cooled to room temperature and the samples were run on a 1.5% agarose gel. For preparation, agarose was solubilized in TAE buffer (40mM Tris-acetate and 1mM EDTA, pH 8.0), at a final concentration of 1.5%, with microwave heating. At a temperature of approximately 50°C, a 0.1% SYBR Safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific) was added to the gel. The gel was transferred to a horizontal electrophoresis vessel containing TAE buffer. Samples were resuspended in 6-fold concentrated running buffer [30% glycerol and 0.1% bromophenol blue] and applied to the gel. Runs were performed at 45V, 100mA, 150W, for 2 hours and 40 minutes. Image acquisition of the gels was performed in ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories) using Image Lab software (Bio-Rad Laboratories).

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Prisma 8.0 program (Graph Pad Software). All variables were tested for normal distribution and homogeneous variance. The test applied was the One-way ANOVA with Bonferroni post-test. Results were expressed as mean and  $\pm$  standard deviation), with observed differences being considered significant when  $p < 0.05$ .

## **Results**

### **rMIC1 and rMIC4 interaction with cell receptors of Jurkat cells is impacted by temperature**

rMIC1 and rMIC4 proteins have been associated with the function of interacting with glycosylated receptors on the surface of cells, therefore providing a stronger interaction between host cells and parasites in the infection of *T. gondii* infection. However, there are no data in the literature demonstrating which factors interfere with the recognition of micronemes proteins of the parasite and human T lymphocyte cells. We started our study by evaluating the effect of temperature on the interaction between rMIC1

or rMIC4 labeled with biotin, with receptors expressed on the surface of Jurkat cells in three different temperature conditions 4, 25, and 37°C. Our data suggest that rMIC1 interacts better at 37°C and lesser at 4°C. rMIC4 bind to glycosylated receptors and appears to be less influenced by temperature. Next, we examined the effect of different concentrations on rMIC1 and rMIC4 binding on lymphocyte cells. Our results suggest that rMIC1 has a better interaction at 20µg/mL, which gradually reduced the binding affinity with the use of higher concentrations of that lectin. For rMIC4, we noticed that the variation in concentration does not seem to exert any effect on the recognition of glycans on the cell surface. In conjunction, the temperature, and concentration of lectin used in the assay appears to affect more the recognition of carbohydrates by MIC1 than by MIC4.

### **Microneme recognition of human lymphocytes surface receptors is dependent on carbohydrate recognition**

Next, we examined whether in the presence of glycoproteins or cells that had their glycosylated receptors digested by glycosidases would result in alteration of the interaction between rMIC1 and rMIC4 with human T lymphocyte cells. To this end, we evaluated the effect of digestion with neuraminidase and β-galactosidase, or the incubation with the glycoproteins, fetuin and asialofetuin. Moreover, since MIC1 and MIC4 participate in a complex with MIC6 that is exposed on the parasite cell surface at the time of initial of infection of host cells, we evaluated whether the presence of MIC1 or MIC4 could lead to a reduction in the interaction of biotinylated MIC4 or MIC1. Our data suggest that binding of 30µg/mL rMIC1 to Jurkat cells was considerably reduced after digestion with neuraminidase. Furthermore, the same effect was observed in the presence of the glycoprotein fetuin. However, digestion with β-galactosidase or incubation with asialofetuin did not result in a pronounced effect of reducing the interaction between MIC1 and Jurkat cells glycans. An interesting finding was that the concomitant incubation of 30µg/mL rMIC4 with biotinylated rMIC1 led to a considerable reduction in the interaction of rMIC1 with cell surface receptors. We repeated the same experiments with rMIC4 and found that incubation with assialofetuin and digestion of glycans on the cell surface with β-galactosidase significantly reduced the interaction of rMIC4 with Jurkat cells. Furthermore, we demonstrated that treatment to remove sialic acid with neuraminidase or incubation with fetuin did not lead to any impairment of binding of rMIC4 to cell surface receptors. A contrasting finding was that the incubation

of biotinylated rMIC4 with rMIC1 did not reduce the interaction of rMIC4 with cell receptors. Taken together, our data demonstrate that MICs interact with receptors on the cell surface depending on the recognition of carbohydrates, moreover, our data indicate that rMIC1 and rMIC4 seem to modulate the interaction of one lectin when in the presence of the other.

### **MICs induce loss of cell viability in human leukemia cells**

Several works demonstrate the role of lectins in the toxicity of cancer cells, an effect that seems to result from the activation of apoptotic and autophagic pathways (NASCIMENTO *et al.*, 2019; TATSUTA *et al.*, 2013). So far, there is no study in the literature on the killing effect induced by *T. gondii* lectins. In this way, we incubated human Jurkat T cells with different concentrations of rMIC1 and rMIC4 for 24 and 48 hours. The results in Figure 3A and 3B show that rMIC1 and rMIC4 induce loss of viability of the human T lymphocyte lineage with increasing time incubation and with increasing concentration. The discovery of the modulatory effect of rMIC4 on the interaction of rMIC1 with sialylated receptors made us evaluate whether the incubation of rMIC1 and rMIC4 would modify the cytotoxic effect when compared with the stimulus exerted by the lectins separately. Thus, we stimulated the Jurkat cells with rMIC1 and rMIC4 and compared it with the groups stimulated with both lectins at the same time. Data from figure 3C indicate that incubation with rMIC1 and rMIC4 increases toxicity in lymphocytic cells. Lectins can exert cytotoxicity through the recognition of one or more glycosylated receptors present on the surface of cells (SHI *et al.*, 2017). Therefore, we evaluated whether the viability loss effect was dependent on carbohydrate recognition. We carried out the stimulation in the presence or not of glycoproteins that are specifically recognized by MIC1 (fetuin) and MIC4 (asialofetuin) and analyzed if the cytotoxic effect was revert. The data of Figure 3D and 3E demonstrate that to reverse the cytotoxic effect of rMIC1 and rMIC4, 250µg/mL and 125µg/mL of fetuin and asialofetuin, respectively, were required. Taken together, these data demonstrate that MICs cause loss of viability and this occurs through carbohydrate recognition. The results that indicates the cytotoxic effects observed in the Jurkat lymphocytic lineage after incubation with MICs led us to raise the hypothesis that this phenomenon would also occur in other unrelated lineages. Thus, we evaluated whether the MICs would also cause the reduction of viability in myeloid cell lines U937 and THP1. After stimulation with 5µg/mL of rMIC1 or rMIC4 the U937 cell line lose their viability, while THP1 cells appears to be refractory to the

cytotoxic effects of the MICs. These data demonstrate that the cytotoxic effect of MICs does not seem to occur homogeneously in all strains.

### **rMIC1 and rMIC4 alter the growth of Jurkat cells**

The discovery that MICs are capable of reducing cell viability at 24 and 48 hours led us to investigate whether MICs could influence cell growth. We cultured Jurkat cells for 7 consecutive days in presence of different concentrations of MIC1 and MIC4 and evaluated the effect on the growth of these cells. Our data indicate that after 7 days of incubation, the MICs were able to reduce cell growth in a concentration-dependent manner. Next, we evaluated whether the stimulus for 1 hour with different concentrations of rMIC1 and rMIC4 followed by their incubation would be sufficient to reduce the growth of cells in the culture. Our data demonstrate that after 1 hour of stimulation, there is a change in growth only in cells that were stimulated with concentrations greater than 10µg/mL.

### **Recombinant microneme 1 and 4 induces apoptosis in human cell line**

The vast majority of the effects observed after stimulation with lectins on leukemic cells is speculated to result in cross-linking and stimulation of various cell receptors. This activation results in the activation of several signaling cascades resulting in cell proliferation or cell death (BENOIST *et al.*, 2009; BLASCO *et al.*, 1995). Therefore, we investigated the effect of rMIC1 and rMIC4 stimulation by tagging cells with annexin-V and propidium iodide (PI). Figure 5A shows that increasing concentrations of lectins lead to an increase in the proportion of positive cells for annexin V marking of the Jurkat lineage.

The increase in annexin-positive cells led us to investigate whether the cell death effect that occurred after incubation with MICs was apoptosis. One of the hallmarks of apoptosis is the loss of mitochondrial potential. We used the DIOC(6) marker which, due to its cationic characteristic, is retained in healthy cells. After cell death, cells lose the ability to maintain potential and therefore the ability to retain DIOC(6) within the mitochondria. Our data demonstrate that after 24 hours rMIC1 and rMIC4 are able to reduce mitochondrial potential reduction. During cell death by apoptosis, cleavage of several proteins occurs and this leads to cleavage of DNA smaller than 500bp. Our data demonstrate that after 24 hours of stimulation, MICs cause DNA fragmentation. Together these data demonstrate that MICs were causing apoptosis.



### **Emricasan reverts the cytotoxic effects caused by MICs**

To better characterize the pathway caused by the MICs, we performed the marking of caspase 3/7 and caspase 8. As can be seen in figure 14 MIC1 and MIC4 cause an increase in the population of positive cells for caspase3/7. Then, we performed caspase 8 labeling, which could lead to the discovery of the possible mechanism of death caused by MICs. Our data demonstrate that MICs increase the proportion of caspase 8 positive cells 24 hours after the challenge. Apoptosis is a coordinated process that can be activated through two pathways (GREEN, 2019; 2022c). The intrinsic pathway is characterized by the release of mitochondrial contents into the cytoplasm which in turn activates the formation of a multiprotein complex that culminates in the activation of caspase 9. The extrinsic pathway is caused by means of the activation of death receptors located on the cell surface, among them are the receptors of the TNF family, such as Trail and CD95 (ELMORE, 2007). The activation of this pathway leads to the activation of caspase 8 (TUMMERS *et al.*, 2017). Regardless of the activated pathway, the end of activation culminates in the activation of capable executors, caspase 3 and 7, which will cleave several substrates, resulting in cell death. In order to investigate which pathway would be activated after culturing cells with MICs, we performed the labeling with specific probes for caspase 3/7 and caspase 8. The results in figure 6 demonstrate that rMIC1 and rMIC4 activate caspase 3/7/8, although rMIC1 seems to increase more caspase 8 stainings when compared to rMIC4. Through the use of a PAN Caspase inhibitor, we evaluated whether the death effect would be reversed or not. Our data indicate that the killing effect caused by MICs is dependent on caspase activation.

### **MAPK JNK and p38 are involved in the cytotoxic effects caused by MICs**

Cells respond to cellular stress in several ways, and MAPK activation is one of the ways cells respond to aggressive stimuli. MAPK has been correlated with cell survival and death in several models. Therefore, we evaluated whether there would be a reversal of harmful effects on cells after inhibition of ERK (PD98), p38 (SB20) and JNK (SP60) with pharmacological inhibitors. Our data indicate that MICs activate cell death cascades in a distinct way. rMIC1 appears to induce cell death through JNK and p38 activation, on the other hand, rMIC4 appears to lead to cell death through p38 activation. Interestingly, the addition of ERK and PI3K pathway inhibitors did not reverse the cytotoxic effect of

MICs, suggesting that these molecules do not seem to participate of the apoptotic effects observed by MICs. None of the lectins seem to induce autophagy, as corroborated by the non-reversal of the cytotoxic effects caused after inhibition of pathways involving PI3K (Figure 7A and 7B).

### **Release of ROS from NADPH oxidase complex is responsible for cell death of human lymphocytes cells**

MAPK p38 and JNK are involved in the cellular stress response. In the literature, it has been demonstrated that after incubation with different lectins, the production of ROS occurs. There are no data in the literature on the increase in ROS production after culture with *Toxoplasma gondii* micronemes. Thus, we evaluated whether the Jurkat lymphocytic cell line would increase ROS production after stimulation with rMIC1 or rMIC4. Our data indicate that after 2 hours of stimulation with MIC1 or MIC4, there was an increase in ROS detection. Next, we evaluated the source of ROS production using an inhibitor of the NADPH oxidase complex (DPI) and the use of a reducing agent that is preferentially sequestered into the mitochondria (MIT). Our data suggest that only the NADPH oxidase inhibitor was able to block ROS release, but not the ROS inhibitor from mitochondria. We then evaluated whether the addition of the ROS scavenger, NAC, would reduce the killing effect caused by MICs by reducing the population of caspase3/7 and PI-positive cells. Our data show that stimulation of MICs with reducing agents causes reversal of increases in both caspase 3/7 and PI positive cells. Taken together, these data demonstrate that ROS production leads to caspase activation leading to human T lymphocyte cells undergoing apoptosis.

### **Discussion**

In the present study, we demonstrate that microneme proteins interact with receptors present on the surface of human lymphocytes. Our data indicate that MIC1 binding is influenced by temperature and the concentration used in the assays. Unlike MIC1, MIC4 binding to Jurkat cells appears to suffer less from temperature and concentration of lectin used. It is important to note that MIC1 and MIC4 interact with lymphocyte cells in dependence on carbohydrate recognition. Although most lectins seem to exert their functions over a wide temperature spectrum, others seem to exert their effect

only within certain temperature ranges (MAYERHOFER *et al.*, 2009). It's possible that at low temperatures MIC1 doesn't have the correct folding and therefore interacts with less affinity to human T lymphocytes. Corroborating this idea, it was shown that at low temperatures *T. gondii* seems to release less microneme content, which results in less cell infection (CARRUTHERS *et al.*, 1999). Moreover, the release of the MIC1/MIC4/MIC6 complex is dependent on the presence and correct folding of its domain (SAOUROS *et al.*, 2005). The inhibition of bind to glycan in T cell receptors observed in MIC1 receptors might be due to saturation of sialyl interaction by MIC1, moreover, this effect is observed in other lectin such as Concanavalin A and Phytohemagglutinin . Our result indicates that the interaction of biotinylated MIC1 with Jurkat cells is reduced when rMIC4 is added, however, we do not observe the same effect when biotinylated rMIC4 is added in the presence of unstaining MIC1. Interestingly, digestion of glycans with neuraminidase present in receptors on the cell surface did not result in the loss of recognition of MIC4 in surface receptors. This results suggests that MIC1 and MIC4 are recognizing different receptors and the inhibitory effect observed is possibly due to a steric impediment provided by MIC4 length.

Several studies have shown that lectins can exert cytotoxic effects on cancer cells. Our data demonstrate that MICs cause cell death as longer they remain in cultures with the cells and this could be the responsible for the reduce growth of Jurkat cells when incubated with MICs. This effect has been observed in other lectins, POL lectin has the effect of increasing the loss of viability as the exposure time in culture with the murine L929 strain is increased (LIU *et al.*, 2009). Surprisingly, MIC1 and MIC4 seems to exert their cytotoxic effects in not all cells. This was demonstrated by the fact that MIC1 and MIC4 induces cell death in U937 cells but not in THP1 cells. This phenomenon might be related to expression of glycan receptors that are recognized by MICs,

In an attempt to discover the mechanism by which recombinant micronemes induces the cell death we discovery that MICs causes activation of caspase, reduction mitochondrial potential and DNA fragmentation. This was accompanied by activation of caspase3/7 and 8 and the used of the pan caspase Emricasan reverts the cytotoxic effects of the MICs. Moreover, activation of cell death was due to activation of MAPK p38 and JNK for MIC1 and only p38 for MIC4.

## References

BACHMANN, M.; KUKKURAINEN, S.; HYTÖNEN, V. P.; WEHRLE-HALLER, B. Cell Adhesion by Integrins. 99, n. 4, p. 1655-1699, 2019.

BENOIST, H.; CULERRIER, R.; POIROUX, G.; SÉGUI, B. *et al.* Two structurally identical mannose-specific jacalin-related lectins display different effects on human T lymphocyte activation and cell death. **The Journal of Biological Chemistry**, 86, n. 1, p. 103-114, 2009.

- BERNIN, H.; LOTTER, H. Sex Bias in the Outcome of Human Tropical Infectious Diseases: Influence of Steroid Hormones. **The Journal of Infectious Diseases**, 209, n. suppl\_3, p. S107-S113, 2014.
- BEVERLEY, J. K. A.; FLECK, D. G.; KWANTES, W.; LUDLAM, G. B. Age–sex distribution of various diseases with particular reference to toxoplasmic lymphadenopathy. **Journal of Hygiene**, 76, n. 2, p. 215-228, 1976.
- BHUTIA, S. K.; PANDA, P. K.; SINHA, N.; PRAHARAJ, P. P. *et al.* Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological Research**, 144, p. 8-18, 2019/06/01/ 2019.
- BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. 64, n. 3, p. 607-623, 2000.
- BLACKWELL, J.; NEWBOLD, C.; TURNER, M.; VICKERMAN, K. *et al.* Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. 357, n. 1417, p. 81-88, 2002.
- BLASCO, E.; BARRA, A.; NICOLAS, M.; LECRON, J.-C. *et al.* Proliferative response of human CD4+ T lymphocytes stimulated by the lectin jacalin. 25, n. 7, p. 2010-2018, 1995.
- BÜSSING, A.; SUZART, K.; BERGMANN, J.; PFÜLLER, U. *et al.* Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins. **Cancer Letters**, 99, n. 1, p. 59-72, 1996.
- CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, 10, n. 1, p. 83-89, 2007.
- CARRUTHERS, V. B.; GIDDINGS, O. K.; SIBLEY, L. D. Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. 1, n. 3, p. 225-235, 1999.
- CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **Eur J Cell Biol**, 73, n. 2, p. 114-123, Jun 1997a.
- CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **Eur J Cell Biol**, 73, n. 2, p. 114-123, 1997b.
- CARRUTHERS, V. B.; TOMLEY, F. M. Microneme Proteins in Apicomplexans. *In*: BURLEIGH, B. A. e SOLDATI-FAVRE, D. (Ed.). **Molecular Mechanisms of Parasite Invasion: Subcellular Biochemistry**. New York, NY: Springer New York, 2008. p. 33-45.
- ČERNOCKÁ, H.; ŘÍMÁNKOVÁ, L.; OSTATNÁ, V. Fetuin and asialofetuin at charged surfaces: Influence of sialic acid presence. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 902, p. 115801, 2021.

COOK, J. H.; UENO, N.; LODOEN, M. B. Toxoplasma gondii disrupts  $\beta$ 1 integrin signaling and focal adhesion formation during monocyte hypermotility. **Journal of Biological Chemistry**, 293, n. 9, p. 3374-3385, 2018.

COURRET, N.; DANCHE, S.; SONIGO, P.; MILON, G. v. *et al.* CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single Toxoplasma gondii tachyzoites to the brain. **Blood**, 107, n. 1, p. 309-316, 2006.

CUMMINGS, R. D.; CHIFFOLEAU, E.; VAN KYOOK, Y.; MCEVER, R. P. C-Type Lectins. *In*: VARKI, A.; CUMMINGS, R. D., *et al.* (Ed.). **Essentials of Glycobiology**. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press

Copyright © 2022 The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California; published by Cold Spring Harbor Laboratory Press; doi:10.1101/glycobiology.4e.34. All rights reserved., 2022. p. 455-474.

DA GAMA, L. M.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; GUIMARÃES, U.; ARNHOLDT, A. C. V. Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with Toxoplasma gondii. **Microbes and Infection**, 6, n. 14, p. 1287-1296, 2004.

DARDÉ, M.-L.; MERCIER, A.; SU, C.; KHAN, A. *et al.* Chapter 3 - Molecular epidemiology and population structure of Toxoplasma gondii. *In*: WEISS, L. M. e KIM, K. (Ed.). **Toxoplasma gondii (Third Edition)**: Academic Press, 2020. p. 63-116.

DENG, Y.; REN, X.; YANG, L.; LIN, Y. *et al.* A JNK-Dependent Pathway Is Required for TNF $\alpha$ -Induced Apoptosis. **Cell**, 115, n. 1, p. 61-70, 2003.

DEROUIN, F.; PELLOUX, H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. **Clinical Microbiology and Infection**, 14, n. 12, p. 1089-1101, 2008.

DHANASEKARAN, D. N.; REDDY, E. P. JNK signaling in apoptosis. **Oncogene**, 27, n. 48, p. 6245-6251, 2008.

DUBEY, J. P. Chapter 1 - The history and life cycle of Toxoplasma gondii. *In*: WEISS, L. M. e KIM, K. (Ed.). **Toxoplasma gondii (Third Edition)**: Academic Press, 2020. p. 1-19.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of Toxoplasma gondii Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUBOIS, D. J.; SOLDATI-FAVRE, D. Biogenesis and secretion of micronemes in Toxoplasma gondii. 21, n. 5, p. e13018, 2019.

- ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.
- ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOYAMA, H.; OKAWA, K. *et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, 391, n. 6662, p. 43-50, 1998.
- FAN, M.; CHAMBERS, T. C. Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. **Drug Resistance Updates**, 4, n. 4, p. 253-267, 2001/08/01/ 2001.
- FARLEY, N.; PEDRAZA-ALVA, G.; SERRANO-GOMEZ, D.; NAGALEEKAR, V. *et al.* p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Mediates the Fas-Induced Mitochondrial Death Pathway in CD8+ T Cells. 26, n. 6, p. 2118-2129, 2006.
- FOURMAUX, M. N.; ACHBAROU, A.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; BIDERRE, C. *et al.* The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 83, n. 2, p. 201-210, 1996.
- FRIEDRICH, N.; SANTOS, J. M.; LIU, Y.; PALMA, A. S. *et al.* Members of a Novel Protein Family Containing Microneme Adhesive Repeat Domains Act as Sialic Acid-binding Lectins during Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites **Journal of Biological Chemistry**, 285, n. 3, p. 2064-2076, 2010.
- FU, L.-I.; ZHOU, C.-c.; YAO, S.; YU, J.-y. *et al.* Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 43, n. 10, p. 1442-1449, 2011.
- GIEFING-KRÖLL, C.; BERGER, P.; LEPPERDINGER, G.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. 14, n. 3, p. 309-321, 2015.
- GREEN, D. R. The Coming Decade of Cell Death Research: Five Riddles. **Cell**, 177, n. 5, p. 1094-1107, 2019/05/16/ 2019.
- GREEN, D. R. Caspase Activation and Inhibition. 14, n. 8, 2022a.
- GREEN, D. R. The Death Receptor Pathway of Apoptosis. 14, n. 2, 2022b.
- GREEN, D. R. A Matter of Life and Death. 14, n. 1, 2022c.
- GRIFFITHS, G. D.; LEEK, M. D.; GEE, D. J. The toxic plant proteins ricin and abrin induce apoptotic changes in mammalian lymphoid tissues and intestine. 151, n. 3, p. 221-229, 1987.
- HARPER, J. M.; HOFF, E. F.; CARRUTHERS, V. B. Multimerization of the *Toxoplasma gondii* MIC2 integrin-like A-domain is required for binding to heparin and human cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 134, n. 2, p. 201-212, 2004.

- HILL, D.; DUBEY, J. P. Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, 8, n. 10, p. 634-640, 2002.
- JULIEN, O.; WELLS, J. A. Caspases and their substrates. **Cell Death & Differentiation**, 24, n. 8, p. 1380-1389, 2017/08/01 2017.
- KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. **British Journal of Cancer**, 26, n. 4, p. 239-257, 1972.
- LAMBERT, H.; DELLACASA-LINDBERG, I.; BARRAGAN, A. Migratory responses of leukocytes infected with Toxoplasma gondii. **Microbes and Infection**, 13, n. 1, p. 96-102, 2011.
- LIU, B.; ZHANG, B.; MIN, M.-w.; BIAN, H.-j. *et al.* Induction of apoptosis by Polygonatum odoratum lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1790, n. 8, p. 840-844, 2009.
- LIU, D.; WANG, S.; ZHANG, J.; XIAO, W. *et al.* Site-Specific N- and O-Glycosylation Analysis of Human Plasma Fibronectin. 9, 2021-June-15 2021. Original Research.
- LIU, Q.; LI, F.-C.; ZHOU, C.-X.; ZHU, X.-Q. Research advances in interactions related to Toxoplasma gondii microneme proteins. **Experimental Parasitology**, 176, p. 89-98, 2017.
- LOURENÇO, E. V.; PEREIRA, S. R.; FAÇA, V. M.; COELHO-CASTELO, A. A. M. *et al.* Toxoplasma gondii micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. **Glycobiology**, 11, n. 7, p. 541-547, 2001.
- MADESH, M.; ANTONSSON, B.; SRINIVASULA, S. M.; ALNEMRI, E. S. *et al.* Rapid Kinetics of tBid-induced Cytochrome c and Smac/DIABLO Release and Mitochondrial Depolarization \*. **Journal of Biological Chemistry**, 277, n. 7, p. 5651-5659, 2002.
- MARCHANT, J.; COWPER, B.; LIU, Y.; LAI, L. *et al.* Galactose Recognition by the Apicomplexan Parasite Toxoplasma gondii. **The Journal of Biological Chemistry**, 287, n. 20, p. 16720-16733, 2012.
- MAYERHOFER, P. U.; COOK, J. P.; WAHLMAN, J.; PINHEIRO, T. T. J. *et al.* Ricin A Chain Insertion into Endoplasmic Reticulum Membranes Is Triggered by a Temperature Increase to 37 **Journal of Biological Chemistry**, 284, n. 15, p. 10232-10242, 2009.
- MCAULEY, J. B. Congenital Toxoplasmosis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, 3, n. suppl\_1, p. S30-S35, 2014.



- MEGLI, C. J.; COYNE, C. B. Infections at the maternal–fetal interface: an overview of pathogenesis and defence. **Nature Reviews Microbiology**, 20, n. 2, p. 67-82, 2022.
- MENZIES, F. M.; MACPHAIL, D.; HENRIQUEZ, F. L. The role of chemokines and their receptors during protist parasite infections. **Parasitology**, 143, n. 14, p. 1890-1901, 2016.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.
- MUNIZ-FELICIANO, L.; VAN GROL, J.; PORTILLO, J.-A. C.; LIEW, L. *et al.* Toxoplasma gondii-Induced Activation of EGFR Prevents Autophagy Protein-Mediated Killing of the Parasite. **PLOS Pathogens**, 9, n. 12, p. e1003809, 2013.
- NAGATA, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. 36, n. 1, p. 489-517, 2018.
- NASCIMENTO, A. P. M.; WOLIN, I. A. V.; WELTER, P. G.; HEINRICH, I. A. *et al.* Lectin from Dioclea violacea induces autophagy in U87 glioma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, 134, p. 660-672, 2019/08/01/ 2019.
- OCHIENG, J.; LEITE-BROWNING, M. L.; WARFIELD, P. Regulation of Cellular Adhesion to Extracellular Matrix Proteins by Galectin-3. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 246, n. 3, p. 788-791, 1998.
- ÓLAFSSON, E. B.; BARRAGAN, A. The unicellular eukaryotic parasite Toxoplasma gondii hijacks the migration machinery of mononuclear phagocytes to promote its dissemination. **Biology of the Cell**, n/a, n. n/a, 2020.
- PARSHENKOV, A.; HENNET, T. Glycosylation-Dependent Induction of Programmed Cell Death in Murine Adenocarcinoma Cells. 13, 2022. Original Research.
- PHILLIPS, A. N.; ANTUNES, F.; STERGIOUS, G.; RANKI, A. *et al.* A sex comparison of rates of new AIDS-defining disease and death in 2554 AIDS cases. **AIDS**, 8, n. 6, p. 831-836, 1994.
- REISS, M.; VIEBIG, N.; BRECHT, S.; FOURMAUX, M.-N. *et al.* Identification and Characterization of an Escorter for Two Secretory Adhesins in Toxoplasma gondii. **Journal of Cell Biology**, 152, n. 3, p. 563-578, 2001.
- ROBERTS, C. W.; CRUICKSHANK, S. M.; ALEXANDER, J. Sex-determined resistance to Toxoplasma gondii is associated with temporal differences in cytokine production. **Infection and Immunity**, 63, n. 7, p. 2549-2555, 1995.
- SAEIJ, J. P. J.; BOYLE, J. P.; BOOTHROYD, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in Parasitology**, 21, n. 10, p. 476-481, 2005.

SAOUROS, S.; EDWARDS-JONES, B.; REISS, M.; SAWMYNADEN, K. *et al.* A Novel Galectin-like Domain from *Toxoplasma gondii* Micronemal Protein 1 Assists the Folding, Assembly, and Transport of a Cell Adhesion Complex\*. **Journal of Biological Chemistry**, 280, n. 46, p. 38583-38591, 2005/11/18/ 2005.

SARDINHA-SILVA, A.; MENDONÇA-NATIVIDADE, F. C.; PINZAN, C. F.; LOPES, C. D. *et al.* The lectin-specific activity of *Toxoplasma gondii* microneme proteins 1 and 4 binds Toll-like receptor 2 and 4 N-glycans to regulate innate immune priming. **PLOS Pathogens**, 15, n. 6, p. e1007871, 2019.

SCHWARTZMAN, J. D.; SAFFER, L. D. How *Toxoplasma gondii* Gets In and Out of Host Cells. *In*: AVILA, J. L. e HARRIS, J. R. (Ed.). **Intracellular Parasites**. Boston, MA: Springer US, 1992. p. 333-364.

SHI, Z.; LI, W.-w.; TANG, Y.; CHENG, L.-j. A Novel Molecular Model of Plant Lectin-Induced Programmed Cell Death in Cancer. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 40, n. 10, p. 1625-1629, 2017.

SINGH, R.; NAWALE, L.; SARKAR, D.; SURESH, C. G. Two Chitotriose-Specific Lectins Show Anti-Angiogenesis, Induces Caspase-9-Mediated Apoptosis and Early Arrest of Pancreatic Tumor Cell Cycle. **PLOS ONE**, 11, n. 1, p. e0146110, 2016.

SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, 31, n. 12, p. 1293-1302, 2001.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 11, n. 9, p. 621-632, 2010.

TATSUTA, T.; HOSONO, M.; SUGAWARA, S.; KARIYA, Y. *et al.* Sialic acid-binding lectin (lectin) induces caspase-dependent apoptosis-mediated mitochondrial perturbation in Jurkat cells. **International journal of oncology**, 43, n. 5, p. 1402-1412, 2013.

TEN HOEVE, A. L.; BRAUN, L.; RODRIGUEZ, M. E.; OLIVERA, G. C. *et al.* The *Toxoplasma* effector GRA28 promotes parasite dissemination by inducing dendritic cell-like migratory properties in infected macrophages. **Cell Host & Microbe**, 30, n. 11, p. 1570-1588.e1577, 2022.

TSANEVA, M.; VAN DAMME, E. J. M. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate Journal**, 37, n. 5, p. 533-551, 2020.

TUMMERS, B.; GREEN, D. R. Caspase-8: regulating life and death. 277, n. 1, p. 76-89, 2017.

UENO, N.; LODOEN, M. B. From the blood to the brain: avenues of eukaryotic pathogen dissemination to the central nervous system. **Current Opinion in Microbiology**, 26, p. 53-59, 2015.

WALKER, W.; ROBERTS, C. W.; FERGUSON, D. J.; JEBBARI, H. *et al.* Innate immunity to *Toxoplasma gondii* is influenced by gender and is associated with differences in interleukin-12 and gamma interferon production. **Infection and Immunity**, 65, n. 3, p. 1119-1121, 1997.

WANG, H.; NG, T. B.; OOI, V. E. C.; LIU, W. K. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 32, n. 3, p. 365-372, 2000.

WESSELBORG, S.; KABELITZ, D. Activation-Driven Death of Human T Cell Clones: Time Course Kinetics of the Induction of Cell Shrinkage, DNA Fragmentation, and Cell Death. **Cellular Immunology**, 148, n. 1, p. 234-241, 1993.

WONG, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, 30, n. 1, p. 87, 2011.

YUE, J.; LÓPEZ, J. M. Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. 21, n. 7, p. 2346, 2020.

ZHU, J.; WANG, Y.; CAO, Y.; SHEN, J. *et al.* Diverse Roles of TgMIC1/4/6 in the *Toxoplasma* Infection. 12, 2021. Review.

## Figures legends

**Figure 1: MIC1 is influenced by temperature and concentration of lectin used during the recognition of glycans present on the surface of human T lymphocytes.** A- Jurkat cells at a density of  $5 \times 10^5$  cells/ml were fixed with paraformaldehyde in 4% PBS. Then, cells were incubated with  $30 \mu\text{g/ml}$  of biotinylated rMIC1 or rMIC4. The cells were incubated at three different temperatures  $4^\circ$ ,  $25^\circ\text{C}$ , and  $37^\circ\text{C}$  for 2 hours. After incubation, cells were washed and labeled with streptavidin-FITC for 40 minutes. After two consecutive washes, the labeled cell suspensions were acquired in the Guava EasyCyte Mini cytometer and the data were analyzed using the FlowJow program. B-C Jurkat cells at a density of  $5 \times 10^5$  cells/ml were fixed with paraformaldehyde in 4% PBS. Then, cells were incubated with 20, 30, and  $40 \mu\text{g/ml}$  of biotinylated rMIC1 (B) or rMIC4 (C). The cells were incubated at three different temperatures  $4^\circ$ ,  $25^\circ\text{C}$ , and  $37^\circ\text{C}$  for 2 hours. After incubation, cells were washed and labeled with streptavidin-FITC for 40 minutes. After two consecutive washes, the labeled cell suspensions were acquired in the Guava EasyCyte Mini cytometer and the data were analyzed using the FlowJow program. Results are expressed as Mean  $\pm$  Standard Deviation. Statistical analysis was performed using the ANOVA test followed by the Bonferroni post-test. \* $P < 0.05$  compared to the streptavidin-only group.

**Figure 2: Interaction of rMIC1 and rMIC4 with cell surface glycans is dependent on carbohydrate recognition and is reduced when rMIC4 is added.** Cell suspensions of human lymphocytes at a density of  $5 \times 10^5$  cells/ml were fixed with paraformaldehyde in 4% PBS. Then, the cells were digested with neuraminidase or  $\beta$ -galactosidase for 1 hour at  $37^\circ\text{C}$ . After washing the cells with PBS, the cells were incubated with  $30 \mu\text{g/mL}$  of biotinylated rMIC1 (A) or rMIC4 (B) for 2 hours at  $37^\circ\text{C}$ . In experiments where inhibition with specific glycoproteins was sought,  $400 \mu\text{g/mL}$  of fetuin or asialofetuin was added. To evaluate the effect of MICs on binding to another microneme, we incubated both lectins at a concentration of  $30 \mu\text{g/mL}$ . After incubation, cells were washed and labeled with streptavidin-FITC for 40 minutes. After two consecutive washes, the labeled cell suspensions were acquired in the Guava EasyCyte Mini cytometer and the data were analyzed using the FlowJow program. Results are expressed as Mean  $\pm$  Standard Deviation. Statistical analysis was performed using the ANOVA test followed by the Bonferroni post-test. \* $P < 0.05$  compared to the streptavidin-only group.

**Figure 3: Jurkat cells lose viability after stimulation with rMIC1 or rMIC4 dependent on carbohydrate recognition.** Jurkat cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were stimulated with increasing concentrations of MIC1 (A) or MIC4 (B) for 24 or 48 hours. To assess whether the cytotoxic effect was increased, we stimulated cell cultures of human T lymphocytes with  $5 \mu\text{g/mL}$  of rMIC1 and  $5 \mu\text{g/mL}$  of rMIC4 and compared with the groups stimulated separately with  $5 \mu\text{g/mL}$  of rMIC1 or  $5 \mu\text{g/mL}$  of rMIC4 (C). To assess whether the cytotoxic effects of MICs were dependent on carbohydrate recognition. Different concentrations of fetuin and asialofetuin glycoproteins were used, glycoproteins that bind specifically to rMIC1 (D) and rMIC4 (E). To assess whether the effect or toxic effects occurred in all types of cells, we stimulated cell cultures of the myeloid cell lines THP1 (F) and U937 (G) at a density of  $2 \times 10^5$  cells/mL with  $5 \mu\text{g/mL}$  of rMIC1 or rMIC4 and evaluated the viability. The percentage of viability was obtained by reading the absorbance at 570nm of the cell lysate, where formazan accumulates as a product of MTT reduction. Results are expressed as Mean  $\pm$  Standard Deviation. Statistical analysis was performed using the ANOVA test followed by the Bonferroni post-test. \* $P < 0.05$  in relation to the non-stimulated group.

**Figure 4: rMIC1 and rMIC4 affect cell growth of human lymphocytic strain Jurkat when incubated for prolonged times.** Cell suspensions of the Jurkat lineage at  $3 \times 10^4$  cells/mL were stimulated for 7

consecutive days in the presence of different concentrations of rMIC1 (A) or rMIC4 (B). In other experiments (C and D), cells were stimulated for only 1 hour with lectins followed by centrifugation and resuspension with new medium. Cells were plated and grown for 7 consecutive days. The percentage of growth was obtained by reading the absorbance at 570nm of the cell lysate, where formazan accumulates as a product of MTT reduction. Results are expressed as Mean  $\pm$  Standard Deviation. Statistical analysis was performed using the ANOVA test followed by the Bonferroni post-test. \* $p < 0.05$  compared to control without inhibitor.

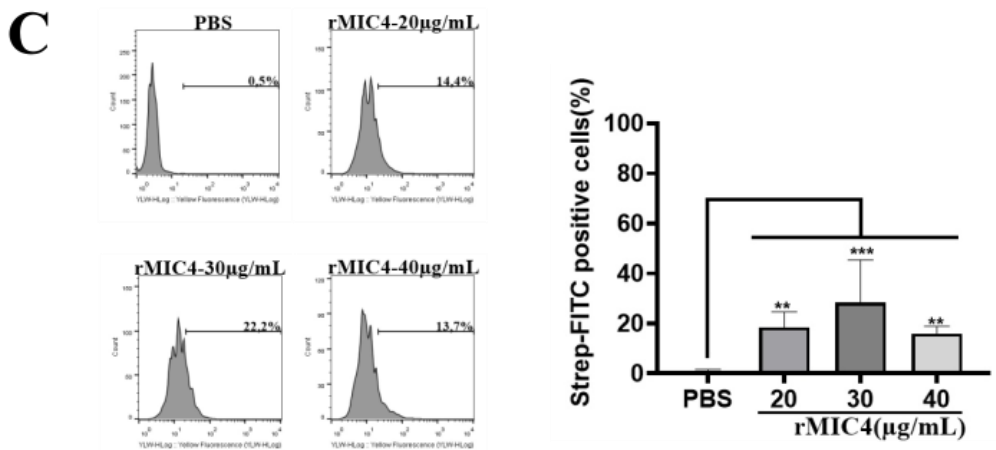
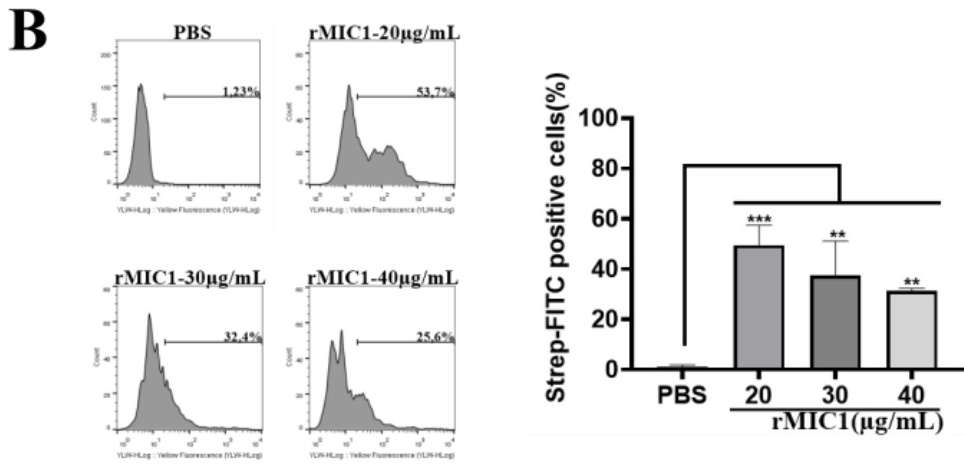
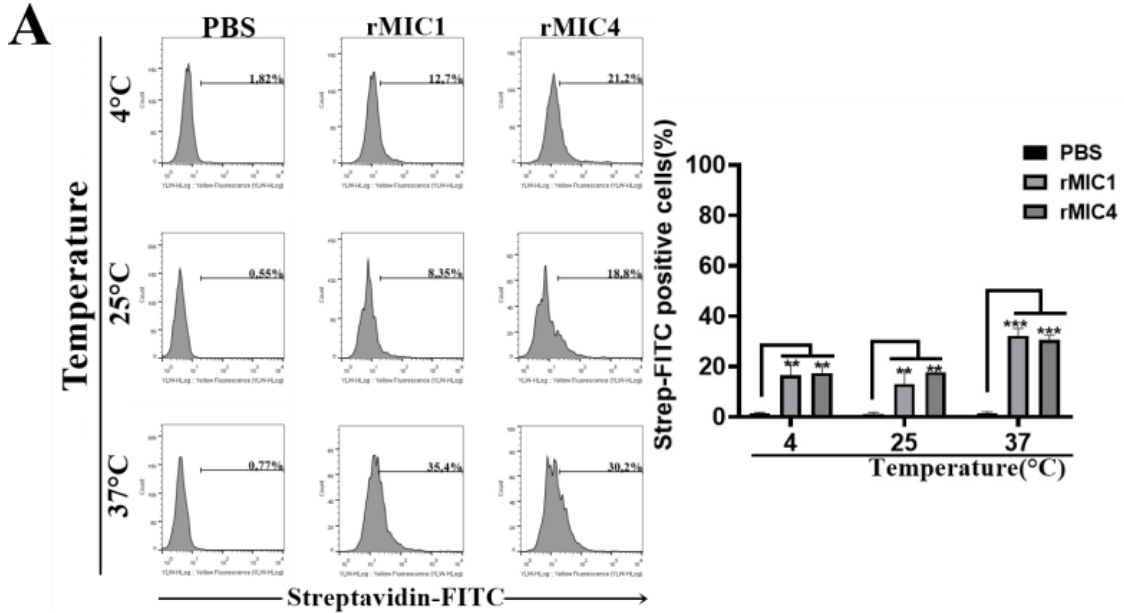
**Figure 5: rMIC1 and rMIC4 cause apoptosis in human T lymphocyte cells.** A- Jurkat cells at  $2.5 \times 10^5$  cell/mL were stimulated for 24 hours with different concentrations of rMIC1 and rMIC4. After incubation, the cells were labeled with Annexin V and PI cells were acquired on the Guava EasyCyte Mini System cytometer. The analysis of the data was performed using the FlowJow V10. B- The mitochondrial potential Cell cultures of Jurkat at a density of  $3.0 \times 10^5$  cells/ml were stimulated with different concentrations of MIC1r or MIC4r. After 24 hours of stimulation, cells were labeled with DIOC6 at a concentration of 50nM for 10 minutes. After labeling, the cells were washed in PBS heated to 37°C, and centrifuged for 10 minutes at  $300 \times g$ . The cells were resuspended in 300 $\mu$ L of RPMI medium and acquired in a FACS cytometer. The analysis was carried out with the help of the FLOWJO X program. The numbers indicated in each gate represent the amount of reduction of the DIOC(6) labeling that occurred after stimulation with PBS, MIC1r, MIC4r, and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. C- To assess chromatin fragmentation after stimulation Jurkat cell cultures at a density of  $5 \times 10^6$  cells/ml were stimulated with 5 $\mu$ g/ml of rMIC1(2) or rMIC4(3). for 16 hours. Then, the cells were lysed and the genomic DNA was extracted. The extraction products were analyzed on a 1.5% TAE agarose gel. N = negative control (middle). 1=negative control and 4=positive control of chromatin fragmentation - cells stimulated with 10 $\mu$ M As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. M=1kb molecular marker (C). Results are expressed as mean  $\pm$  SD and are representative of three experiments. \* $p < 0.05$  in relation to the non-stimulated cell group.

**Figure 6: MIC1r and MIC4r increase caspase 3/7/8 labeling in Jurkat cells.** (A-B)- Human Lymphocytes T at the density of were stimulated for 24 hours. After stimulation, cells were labeled with specific probes for caspase 3/7 or caspase 8. After washing with PBS, cells were acquired on the Guava EasyCyte Mini System cytometer. (C) Jurkat cells at the density  $2.5 \times 10^5$  células/mL. The analysis was performed using the FlowJow V10 program. (A-B) or the groups of the cells treated only with EMRICASAN (C). Results are expressed as Mean  $\pm$  Standard Deviation. Statistical analysis was performed using the ANOVA test followed by the Bonferroni post-test. \* $P < 0.05$  compared to unstimulated cells

**Figure 7: Evaluation of the inhibition of possible signaling pathways involved in the loss of viability of the human T lymphocyte lineage after stimulation with micronemal proteins.** Suspensions of Jurkat cells at  $2.5 \times 10^5$  cells/mL were incubated or with inhibitors of JNK-IN-8 (5 $\mu$ M), SB20 (10 $\mu$ M), PD98 (15 $\mu$ M), and LY-29(10 $\mu$ M) inhibitors for 1 hour. Then, the cells were stimulated with 5.0 $\mu$ g/mL of rMIC1 or rMIC4 lectins for 24 hours. A-B The percentage of viability was obtained by reading the absorbance at 570nm of the cell lysate, where formazan accumulates as a product of MTT reduction. C-E Positive PI cells were performed as described by materials and methods. Results are expressed as mean  $\pm$  SD and are representative of three experiments. \* $P < 0.05$  compared to control with inhibitor.

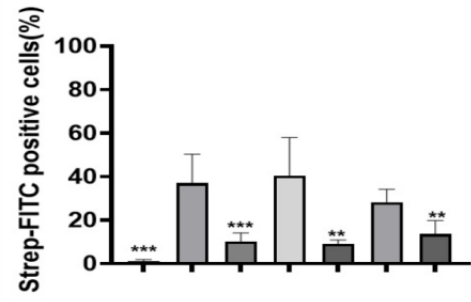
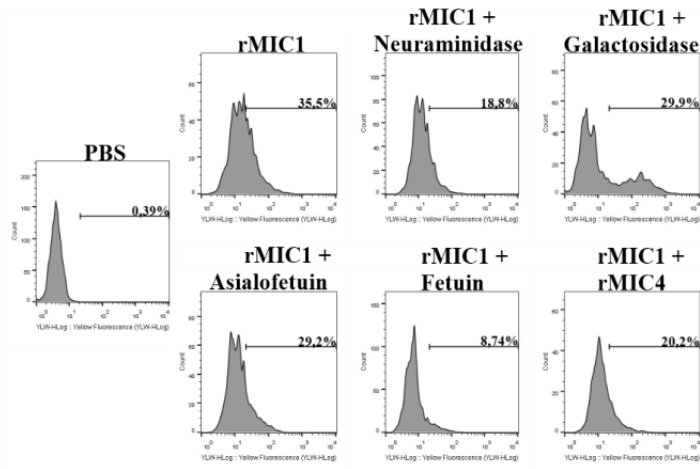
**Figure 8: Increased caspase 3 staining in Jurkat cells stimulated with MIC1r or MIC4r is dependent on ROS release by NADPH oxidase.** A-B. Human lymphocytes at  $2.5 \times 10^5$  cells/mL were stained with 5 $\mu$ M of DFCDA and stimulated with different concentrations of rMIC1 or rMIC4 for 2 hours. C-To identified the source of ROS we incubate the cells were incubated for 45 minutes with MIT(20 $\mu$ M) and DPI (20 $\mu$ M) before the addition of MICs. D-E Cell cultures of the Jurkat lymphoid lineage were stimulated with 5 $\mu$ g/mL of MIC1r or MIC4r in the presence of 1 mM of NAC. After 24 hours, the cells were marked with PI and FAM-Caspase 3/7 and acquired in the Guava EasyCyte Mini System cytometer and the data were analyzed using the FlowJow V10 program. \* $P < 0.05$  in relation to the non-stimulated with MIC1 and MIC4 cell group. Statistically not significant (N.S.).

Figures



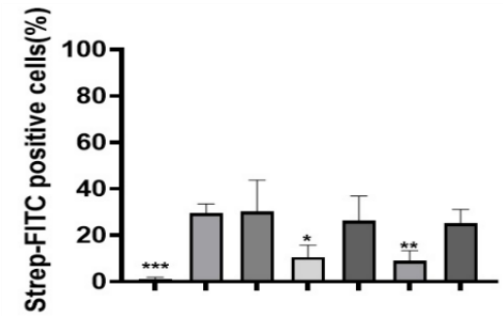
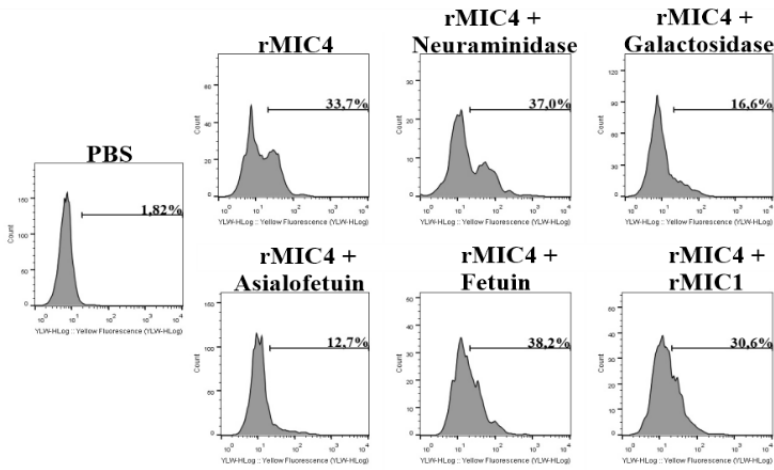
**Figure 1**

**A**



Streptavidin	+	+	+	+	+	+	+
rMIC1		+	+	+	+	+	+
Neuraminidase			+				
Galactosidase				+			
Fetuin					+		
Asialofetuin						+	
rMIC4							+

**B**



Streptavidin	+	+	+	+	+	+	+
rMIC4		+	+	+	+	+	+
Neuraminidase			+				
Galactosidase				+			
Fetuin					+		
Asialofetuin						+	
rMIC1							+

**Figure 2**

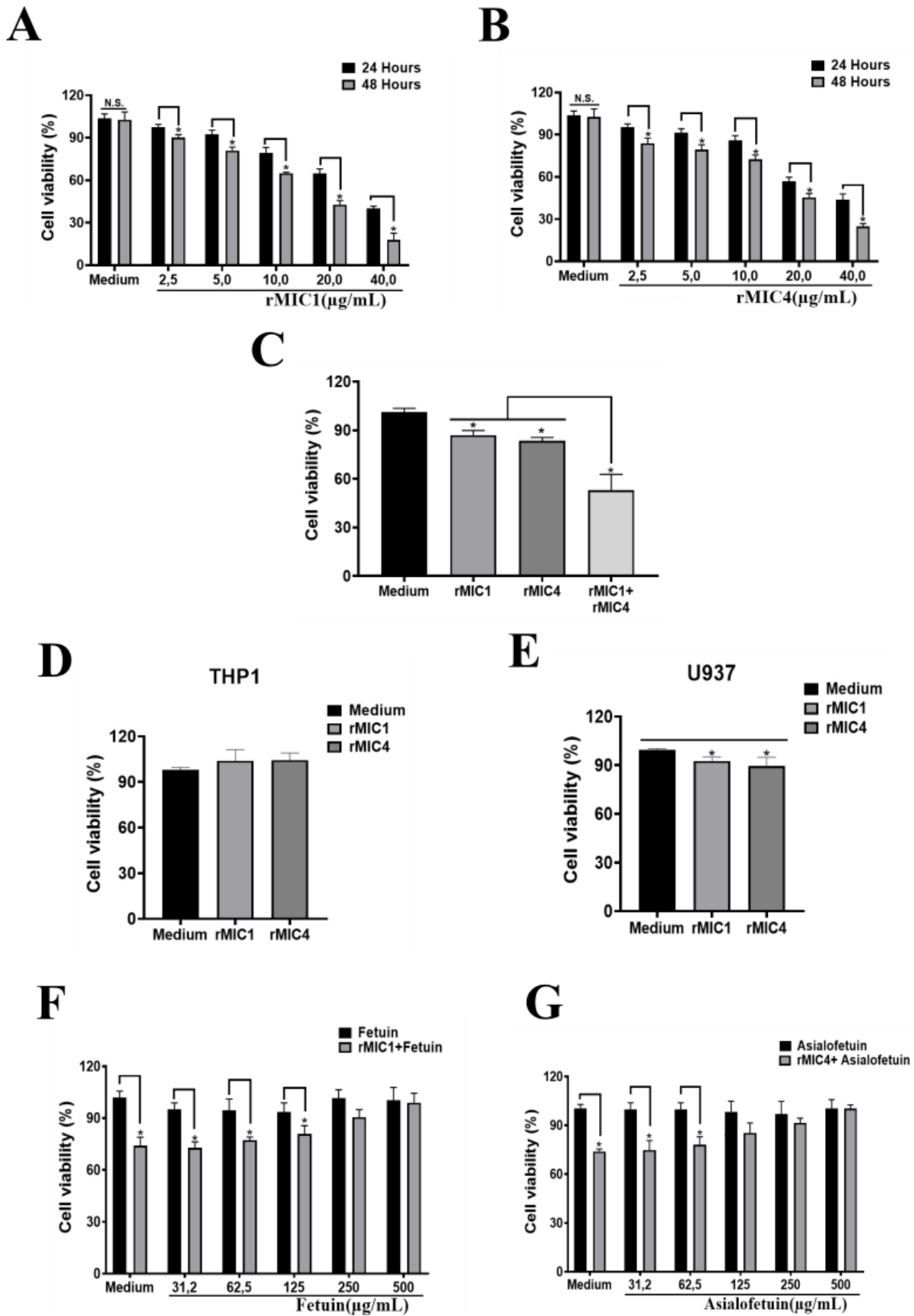


Figure 3



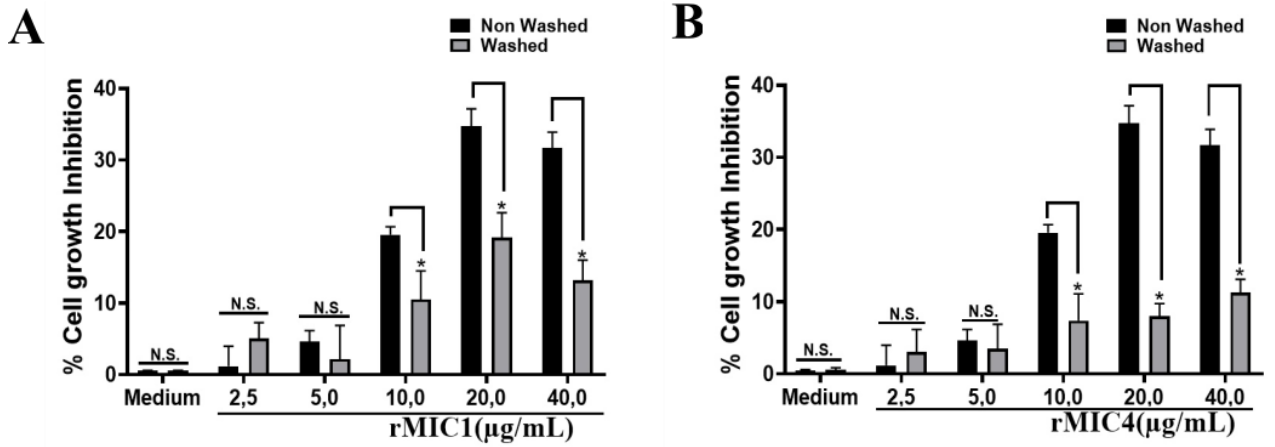


Figure 4

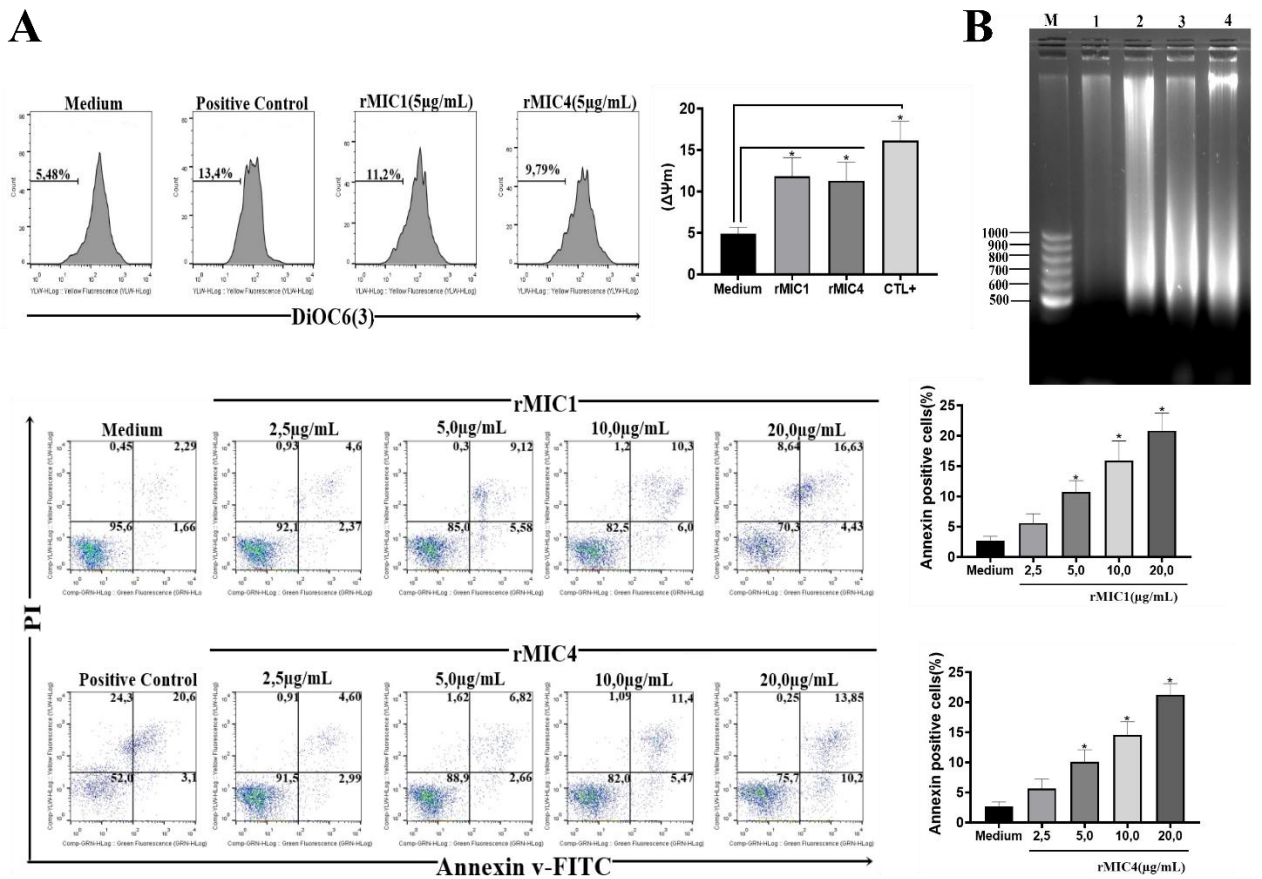
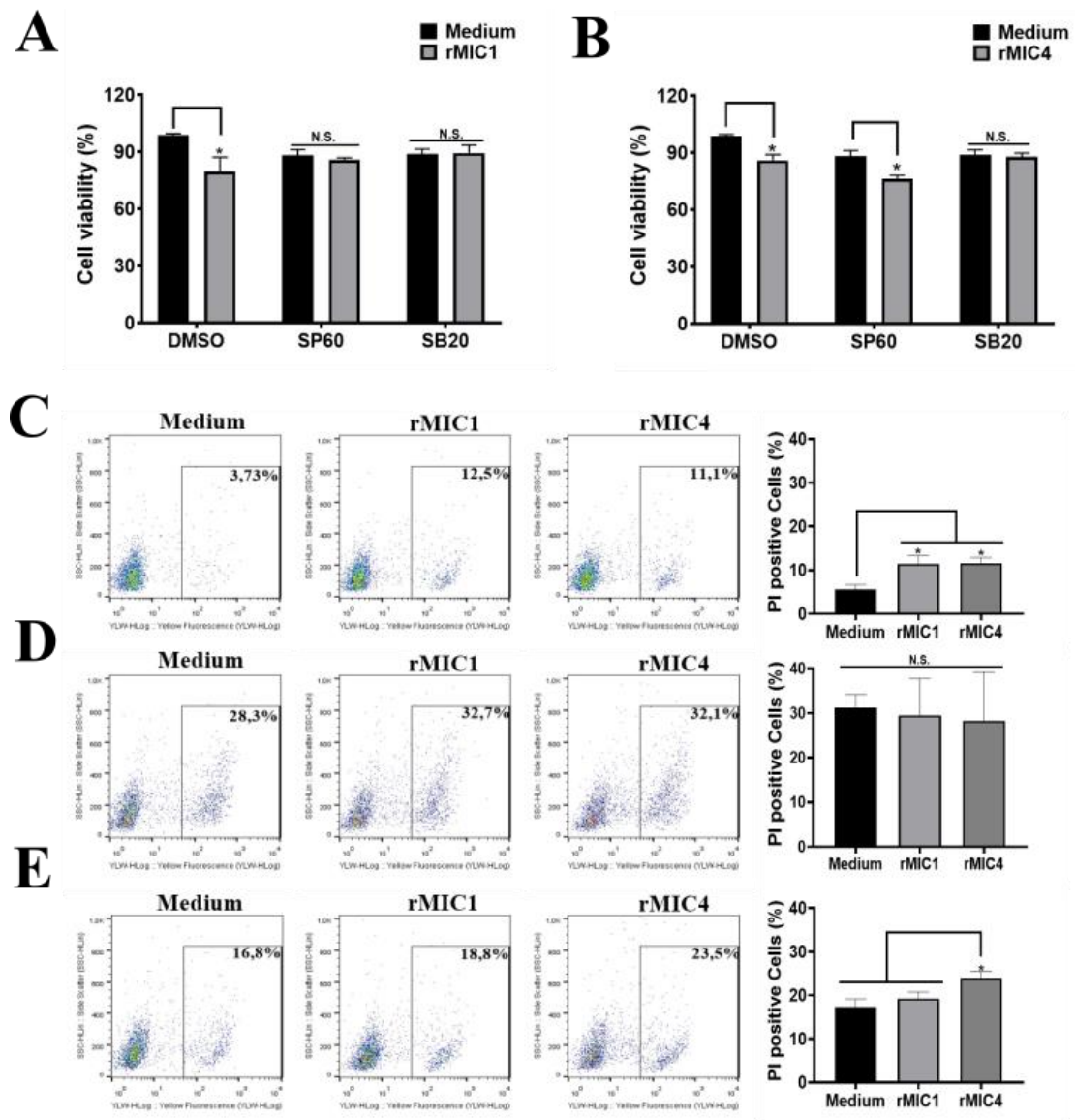
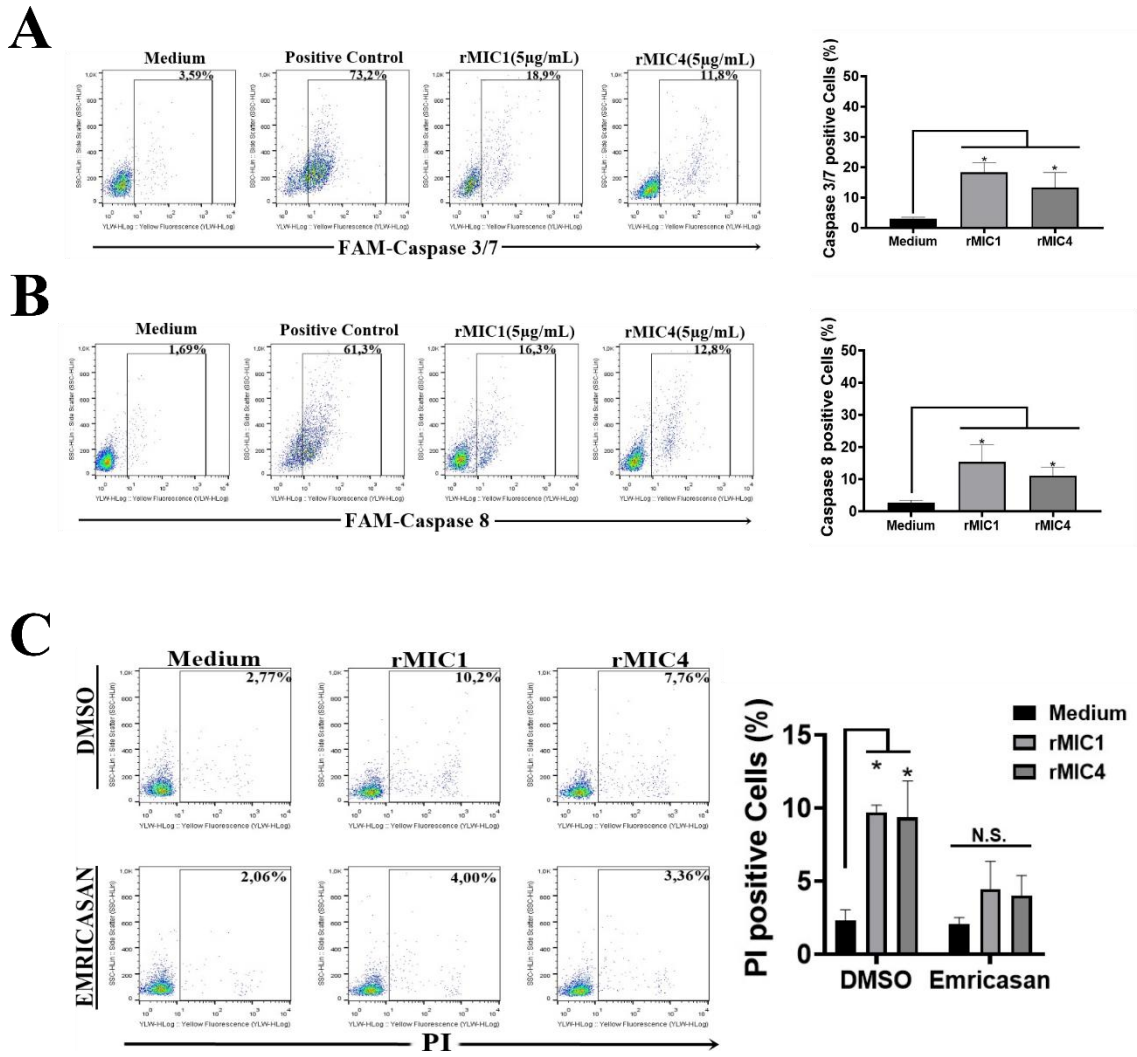


Figure 5

Figure 6





**Figure 7**

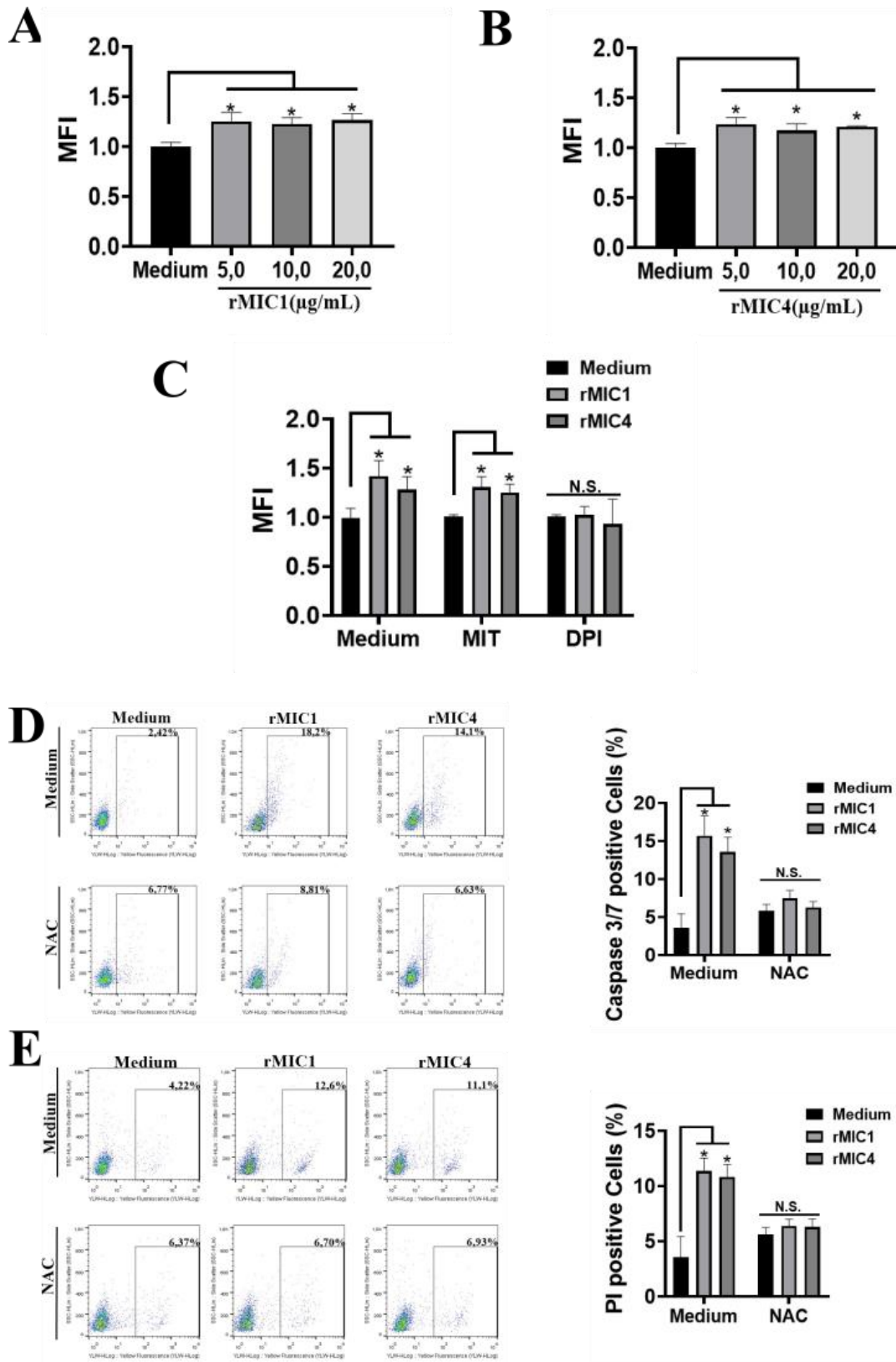


Figure 8

**ANEXO 2: Microneme proteins 1 and 4 from *Toxoplasma gondii* interfere in monocytic cell interaction with fibronectin by two distinct mechanisms**

## **Microneme proteins 1 and 4 from *Toxoplasma gondii* interfere in monocytic cell interaction with fibronectin by two distinct mechanisms**

Souza, I. E. L.<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Laboratory of Immunochemistry and Glycobiology, Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

### **Abstract**

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite that causes toxoplasmosis, which is a disease distributed worldwide. The parasite infects all warm-blooded hosts including humans, where the parasite can cause severe illness in immunocompromised patients and malformation of fetuses. Infection usually occurs through the ingestion of tissue cysts or oocysts that after disruption release the parasites to actively infect the enterocytes and subsequently the cells of the lamina propria. From this initial site, *T. gondii* uses blood and lymphatic vessels to access other tissues, either as free parasite cells or inside infected leukocytes. Cell infection is a multi-step process dependent on the releasing of proteins from peculiar organelles, such as micronemes. These micronemal proteins (MICs) are assembled in adhesive complexes, whose main function is to connect the host cells with the parasite. One of these complexes is formed by the lectins MIC1 and MIC4 that binds terminal sialic acid and galactose, respectively, present in glycoproteins on the surface of host cells, and MIC6, an escort protein for MIC1 and MIC4. In the present study, we showed that MIC1 and MIC4 interact with fibronectin, an extracellular matrix protein, through their carbohydrate recognition domains. The binding of these MICs to fibronectin decreased the adhesion of the human monocytic cell line THP1 with fibronectin via steric blockade. Moreover, our data suggest that MIC1 and MIC4 decrease the interaction of THP1 cells with fibronectin in a time-dependent manner without reducing CD29 receptor expression on the surface of monocytic cells. (Acho que falta uma frase final para explicar a possível implicação dessa diminuição de interação)

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, microneme, monocytes, extracellular matrix, fibronectin.

## Introduction

Toxoplasmosis is a disease caused by the obligate intracellular protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*, which is disseminated worldwide and can infect virtually all nucleated cells from warm-blooded hosts (HILL et al., 2002). In humans, although *T. gondii* causes benign infections in most cases, it can lead to defective formation in fetuses and severe disease in immunocompromised patients (MONTROYA et al., 2004). Transmission of toxoplasmosis occurs in two main ways: vertically from mother to fetus or horizontally by ingesting tissue cysts in raw or undercooked meat or oocysts in contaminated food or water (DUBEY et al., 1998). The mechanisms by which *T. gondii* bypasses the placental barrier to access the fetus are unclear (MEGLI et al., 2022). On the other hand, horizontal transmission is well known and starts with the release of the parasites into the intestinal lumen, initially infecting and replicating in the enterocytes, spreading out from this infection site, as free parasites or inside cells, through the blood and lymphatic vessels. Interestingly, many studies have shown that monocytes and dendritic cells are the primary cells that scatter the parasite in the host as Trojan horses. *T. gondii* releases molecules that hijack the migratory functions of these cells, which disseminate the parasites while allowing them to evade the immune system (ÓLAFSSON et al., 2020; TEN HOEVE et al., 2022). In addition, *T. gondii* leads to modifications in the expression of leukocyte surface molecules, such as integrins that bind to the extracellular matrix (DA GAMA et al., 2004), as well as a possible change in the production of cytokines or chemokines (MENZIES et al., 2016).

The invasion of the host cell by *T. gondii* is a remarkable multi-step process in which the parasite releases the content of the particular organelles termed rhoptry, microneme, and dense granule. These organelles assist in the invasion, intracellular maintenance, and subsequent exit of the parasitized cell. Micronemes are one of the first to discharge their proteins so that *T. gondii* actively penetrates the host cell (CARRUTHERS et al., 1997a). Upon microneme fusion with the parasite plasma membrane, the microneme proteins are exposed on the parasite cell surface and interact with the host cell molecules, making a bridge between these cells. Some of these micronemal proteins make up oligomeric complexes, such as one that contains microneme protein 1 (MIC1), MIC4, and MIC6 (CARRUTHERS et al., 2008). MIC1 and MIC4 are lectins that assist the adhesion of the parasite by recognizing sialyl and

galactosyl terminal residues, respectively, in glycans on the host cell surface. MIC6 is a type I integral membrane protein that anchors MIC1 and MIC4 and is responsible for escorting these adhesins to the microneme. Besides, MIC6 functions as a link between the parasite and host cells when the adhesins MIC1 and MIC4 bind to host cell glycans at the beginning of the cell invasion (MARCHANT et al., 2012).

Because *T. gondii* seems to regulate leukocyte receptors that bind to components of the extracellular matrix, modulating the migration of the cells (DA GAMA *et al.*, 2004), lectins can modify the migration and interaction of immune cells (CUMMINGS *et al.*, 2022; OCHIENG *et al.*, 1998), and MIC1 and MIC4 lectins appear to have multifunctional domains, we hypothesized that MIC1 and MIC4 might be involved in the migration process of monocytic cells infected with *T. gondii*. Since there are few articles in the literature where researchers use human cells to evaluate *T. gondii* infection, here we sought to investigate whether MIC1 and MIC4 interfere in the binding of the human myeloid cell line THP1 with *fibronectin*, a relevant protein of extracellular matrix. Our results suggest that these MICs reduce the ability of this monocytic cell line to adhere to *fibronectin* by competing with or blocking the site of recognition of THP1 cells in *fibronectin*.

## **Material and Methods**

### Cell culture

THP1 cells (ATCC-TIB-202) were cultured in RPMI medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) supplemented with 2.5g/L of glucose, 10 % fetal serum bovine (FBS) (Thermo Fisher Scientific), 100U/mL penicillin, and 100µg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific). Cells were maintained at the density of  $4 \times 10^5$  cells/mL and the medium was changed every 2-3 days.

### Expression and purification of rMIC1 and rMIC4

The pEXP17 vector containing *T. gondii* MIC1 or MIC4 gene was transformed into the bacteria *E. coli* strain Rosetta (DE3). The bacteria were cultivated in 5 mL of



LB liquid medium (Himedia) supplemented with 100 µg/ mL of ampicillin (Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA) on a shaker at 240 rpm at 37°C for 16 hours. These cultures were diluted 1:100 to a final volume of 500 mL of LB medium containing 100 µg/mL ampicillin and maintained in the same conditions described above. When the cultures reached OD at 600 nm between 0.4 and 0.6, they were induced with 0.5 mM of isopropyl-β-D-1-thiogalactoside (Sigma-Aldrich) for 6 hours to express the proteins. Afterward, the cultures were centrifuged at 7,500 × g, for 15 minutes and the pellets were frozen at -80°C. The recombinant proteins were isolated and solubilized from bacterial pellets, refolded, and detoxified using polymyxin B column, as described by Pinzan et al. (2015). The protein concentration was determined by BCA protein assay kit (Sigma-Aldrich). The samples were stored at -20°C until the moment of use. All purified lots underwent LPS measurement with Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (ThermoFisher) and showed as low as concentration of 0.3 U/mL of LPS.s

#### Transwell migration assay

The polycarbonate membranes with 8-µm pores from inserts of twenty-four-well Transwell plates (Corning) were washed with PBS and pre-incubated with serum-free RPMI media for 30 minutes at 37°C. After removing the media, lower wells were filled with medium RPMI supplemented with 10% of SBF added with MCP-1 at a concentration of 20 ng/mL (Preprotec) or rMIC1 or rMIC4 at a concentration of XX ng/mL. About 4 × 10<sup>5</sup> cells/mL were added to the upper wells, following incubation for 6 hours. The cell migration rate was quantified from the lower compartment by cell counting in a Neubauer chamber.

#### Plate binding assay

Human fibronectin (Sigma Aldrich) at 30 µg/mL was incubated into tissue culture dishes overnight at 4°C. To the wells were added THP1 cells previously treated with 5, 10, or 20 µg/mL of rMIC1 or rMIC4 for X hours. Cells were allowed to adhere for 15 hours at 37°C, afterward, the plates were washed with PBS to remove the non-adherent cells. Adherent cells were fixed for 40 minutes in 4% formaldehyde (Sigma-Aldrich) and then stained for 40 minutes with 0.1% crystal violet (Nuclear-Diadema, Brazil). Stained cells were subsequently solubilized in 10% acetic acid (Merk, cidade,

país). Absorbances were read at 540 nm in a Powerwave Microplate Reader (BIOTEK, cidade, país).

#### Binding of rMIC1 and rMIC4 to fibronectin

Microplate with 96-wells was coated with 20 µg/mL of fibronectin at 4°C for 16 hours. The coated wells were washed once and blocked with a solution of 5% gelatin in PBS for 2 hours. After three washes with PBS, the microplate was incubated with 20 µg/mL of rMIC1, rMIC4, or PBS overnight at 4°C. Next, the microplate was washed five times with PBS and incubated with chicken IgY anti-rMIC1 or anti-rMIC4 for 2 hours. After five washes with PBS, the microplate was incubated with a horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-chicken IgY at 1: 2,000 dilution for 1 hour. The reactions were revealed with the TMB substrate kit (Vector Laboratories, Inc., Newark, USA) and the absorbances read at 450 nm in a Powerwave Microplate Reader (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, USA).

#### Flow cytometry

THP1 cells at  $4,5 \times 10^5$  cells/mL were stimulated with 5µg/mL of rMIC1 or rMIC4 for 15 minutes. Unstimulated cells were used as the negative control. The cells were collected and fixed with a solution of 4% paraformaldehyde in PBS for 45 minutes. The cells were washed in PBS and incubated with Human BD Fc Block (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) for 1 hour. The suspension of cells was washed with PBS and incubated with 1 µg/mL of CD29-FITC for 45 minutes. The cells were washed and acquired in a Guava easyCyte HT System (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), and data were analyzed using FlowJo software (ver. 10.?.?, FlowJo LLC, Ashland, USA).

In the internalization experiments, we performed the biotinylation of rMIC1 and rMIC4 with N-hydroxysuccinimide ester (NHS)-biotin (Sigma-Aldrich) as recommended by the manufacturers. Biotinylated rMIC1 or rMIC4 at 10 µg/mL were added to cultures of THP1 cells ( $4.5 \times 10^5$  cells/mL) for 0, 15, and 30 minutes. After the end of the experiment, THP1 cells were collected and washed twice consecutively in ice-cold PBS plus 400 µg/mL of fetuin or asialofetuin to remove non-internalized MIC1 and MIC4, respectively. Then, the cells were fixed in a 4% paraformaldehyde solution in PBS for 45 minutes. Suspensions were washed in PBS and labeled with 1µg/ml of streptoavidin-FITC (Thermofisher). After washing with PBS, the cells were washed and acquired in the

Guava easyCyte HT System (Merck Millipore), and data was analyzed with FlowJo software (ver. 10.7.7, FlowJo LLC).

### Statistical analysis

One-way ANOVA followed by Bonferroni's test was used to assess the significance between the means of multiple experimental conditions. The unpaired two-tailed t-test was applied to determine the significance between the means of two experimental groups. Differences considered statistically are shown in the figure legend. All statistical tests and plots were performed using GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

## **Results**

### **MIC1 and MIC4 recognize fibronectin and compete for the site of interaction of THP1 cells and fibronectin**

*T. gondii* microneme proteins have been implicated in cell invasion and parasite migration on various substrates, including those from the extracellular matrix (HARPER *et al.*, 2004). Since MIC1 recognizes sialyl terminal residues in glycans while MIC4 binds galactosyl residues, we thought these proteins might interact with fibronectin, a glycoprotein from the extracellular matrix that contains N- and O-glycosylations (LIU *et al.*, 2021). Hence, MIC1 and MIC4 could interfere with the binding of monocytic cells to fibronectin, blocking the recognition site by competition. When we evaluated whether rMIC1 or rMIC4 could directly interact with fibronectin, we observed that both proteins bound to fibronectin with significantly more interaction of rMIC1 than rMIC4 (Figure 1A). Next, we investigated whether rMIC1 and rMIC4 affect the interaction of THP1 cells with fibronectin by using a binding plate assay. When MIC1 or MIC4 was incubated for 1 hour in a fibronectin-coated plate before THP1 cells were added, MIC1 and MIC4 diminished the THP1 cells-fibronectin interaction (Figure 1B) compared with unstimulated cells. In a competitive assay with fetuin and asialofetuin, glycoproteins that contain specific carbohydrates to MIC1 and MIC4, respectively, these MICs were unable to decrease the binding of THP1 cells to fibronectin, suggesting that this phenomenon was dependent on lectin properties of these proteins (Figure 1C).

Afterward, we assessed the effect of different concentrations of MIC1 and MIC4 on the interaction of THP1 cells with fibronectin. When MIC1 or MIC4 was incubated for 1 hour with fibronectin before THP1 cells were added to the wells, MIC1 decreased the THP1 cells-fibronectin interaction in all tested concentrations (5, 10, and 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Figure 2A), while the inhibitory effect of MIC4 was seen only with 10 and 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figure 2B). If we added MIC1 or MIC4 at the same time as THP1 cells in fibronectin-coated wells, decreased binding of cells to fibronectin was evident for both lectins in all conditions tested (Figure 2C and 2D). We noticed similar results to these latter ones when fibronectin-coated wells received THP1 cells 1 hour before the addition of MIC1 and MIC4 (Figures 2E and 2F). Surprisingly, rMIC1 reduced the interaction of THP1 with fibronectin in a more pronounced effect than those observed in rMIC4. Moreover, our data suggested that the maximum reduction of the interaction of THP1 in fibronectin was around 50% demonstrating that the inhibitory effects did not augment in a concentration-dependent manner.

### **Microneme interferes in THP1 cell binding to fibronectin by a distinct mechanism**

We subsequently investigated whether the MIC1 and MIC4 exerted an inhibitory effect by directly modulating the binding of THP1 cells to fibronectin. We stimulated the THP1 cells for 1 hour with the MIC1 or MIC4 and then let the cells be settled in fibronectin-coated wells, incubating them for 0, 15, 30, 45, and 60 minutes. The effect of decreasing THP1 cells-fibronectin interaction by MIC1 and MIC4 was seen only with 15 minutes of stimulation (Figures 4A and 4B). As inhibition of cell binding did not occur after 15 minutes, we hypothesized that cell-bound MICs were been internalized after this time. So we incubated the THP1 cells with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of labeled rMIC1 or rMIC4 for 0, 15, and 30 minutes and washed them at 4°C to remove the non-internalized lectin. We observed that rMIC1 and rMIC4 were mainly internalized after 15 minutes (Figures 4C and 4D).

Integrins are heterodimeric glycoproteins that recognize ECM components, consequently allowing cell migration (BACHMANN *et al.*, 2019). Because the  $\alpha 4\beta 1$  integrin (VLA-4) is expressed in THP1 cells, which recognize fibronectin, we investigated whether stimulation with rMIC1 or rMIC4 could alter the expression of CD29 on the cell surface. As seen in figure 4E, the 15-minute stimulation with rMIC1 or rMIC4 did not reduce CD29 expression on the cell surface, suggesting that CD29 is not involved in this phenomenon triggered by MIC1 and MIC4.

### **MIC1 and MIC4 from *T. gondii* do not modify the migration pattern of THP1 cells**

Because MIC1 and MIC4 could alter the binding of monocytic cells to fibronectin, which is an extracellular matrix protein involved in the migration of these cells, we evaluated whether rMIC1 or rMIC4 has any effect on the chemotaxis of THP1 cells. In a migration assay in transwell, we added cells in the upper chamber, and 5 µg/mL of rMIC1 or rMIC4 in the lower one, allowing the cells to migrate for 4 hours. In contrast to the positive control (MCP-1), rMIC1 and rMIC4 did not induce the migration of the cells.

### **Discussion**

*T. gondii* can modulate host cells to facilitate their survival and spread. Moreover, this pathogen uses infected cells as Trojan horses to migrate from the initial site of infection to other organs such as the brain, lungs, and heart (COURRET *et al.*, 2006; UENO *et al.*, 2015). This occurs through the induction of a hypermigratory behavior that is observed mainly in mononuclear cells (LAMBERT *et al.*, 2011). In an attempt to discover the possible mechanisms that induce this effect, we evaluated whether *T. gondii* recombinant microneme proteins could exert a chemotactic effect on THP1 cells. Our data suggest that rMIC1 or rMIC4 do not induce a migratory effect in monocytic cells.

Interestingly, we demonstrated that rMIC1 and rMIC4 recognized the glycans present in fibronectin through the carbohydrate recognition domain, and this interaction likely induces steric hindrance and therefore blocks or competes with the site of ligation of integrin of monocytic cells. Yet, incubation of rMIC1 or rMIC4 with specific glycoproteins reverses this effect indicating that the interaction of MICs with these glycoproteins depends on carbohydrate recognition. Galectin-3, a  $\beta$ -galactosyl lectin, has been shown to cause similar inhibition effects in different cell lines, and this effect was reverting by incubation with lactose (OCHIENG *et al.*, 1998). Microneme proteins have been shown as important to gliding migration in the matrix substrate by the parasite and

MIC1 knockout parasites likely migrate less when compared with wild-type parasites. It is reasonable that MIC1 and MIC4 are used to migrate in the ECM to infect other cells. This hypothesis is supported by the discovery that MIC2, another microneme protein, interacts with heparin, a component of ECM. Interestingly, MIC2 has more affinity to heparin than other components of ECM, such as collagen, fibronectin, and lamin (HARPER *et al.*, 2004). Therefore, the possibly different affinity of micronemes proteins to distinct components of ECM allows the parasite to better adapt to a different environment.

Besides the indirect effects caused by competition or blocking the contact of THP1 cells in fibronectin-coated wells, we observed that rMIC1 and rMIC4 directly modify the affinity of these cells to the fibronectin, demonstrating an alternative mechanism. Cook *et al.* (2018) demonstrated that the possible mechanism involving the increase in the migration of leukocytes infected by *T. gondii* would occur through the modulation of the interaction of mononuclear cells with fibronectin. Moreover, the authors suggested that this effect was independent of  $\beta 1$  integrin internalization (COOK *et al.*, 2018). These data corroborate our finds that rMIC1 and rMIC4 directly modulate the affinity of THP1 cells to fibronectin without reducing the expression of CD29. Yet, we show that this effect was time-dependent and that this occurs in the first 15 minutes, possibly due to internalization of the MICs. Indeed, our data show an augmented detection of internalized biotinylated rMIC1 and rMIC4.

Taken together, we show for the first time that MIC1 and MIC4 exert an inhibitory effect on the interaction of THP1 cells in fibronectin by a distinct mechanism.

## References

BACHMANN, M.; KUKKURAINEN, S.; HYTÖNEN, V. P.; WEHRLE-HALLER, B. Cell Adhesion by Integrins. 99, n. 4, p. 1655-1699, 2019.

BENOIST, H.; CULERRIER, R.; POIROUX, G.; SÉGUI, B. *et al.* Two structurally identical mannose-specific jacalin-related lectins display different effects on human T lymphocyte activation and cell death. **The Journal of Biological Chemistry**, 86, n. 1, p. 103-114, 2009.

BERNIN, H.; LOTTER, H. Sex Bias in the Outcome of Human Tropical Infectious Diseases: Influence of Steroid Hormones. **The Journal of Infectious Diseases**, 209, n. suppl\_3, p. S107-S113, 2014.

BEVERLEY, J. K. A.; FLECK, D. G.; KWANTES, W.; LUDLAM, G. B. Age–sex distribution of various diseases with particular reference to toxoplasmic lymphadenopathy. **Journal of Hygiene**, 76, n. 2, p. 215-228, 1976.

BHUTIA, S. K.; PANDA, P. K.; SINHA, N.; PRAHARAJ, P. P. *et al.* Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological Research**, 144, p. 8-18, 2019/06/01/ 2019.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. 64, n. 3, p. 607-623, 2000.

BLACKWELL, J.; NEWBOLD, C.; TURNER, M.; VICKERMAN, K. *et al.* Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. 357, n. 1417, p. 81-88, 2002.

BLASCO, E.; BARRA, A.; NICOLAS, M.; LECRON, J.-C. *et al.* Proliferative response of human CD4+ T lymphocytes stimulated by the lectin jacalin. 25, n. 7, p. 2010-2018, 1995.

BÜSSING, A.; SUZART, K.; BERGMANN, J.; PFÜLLER, U. *et al.* Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album L.* is mediated by the mistletoe lectins. **Cancer Letters**, 99, n. 1, p. 59-72, 1996.

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, 10, n. 1, p. 83-89, 2007.

CARRUTHERS, V. B.; GIDDINGS, O. K.; SIBLEY, L. D. Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. 1, n. 3, p. 225-235, 1999.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **Eur J Cell Biol**, 73, n. 2, p. 114-123, Jun 1997a.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **Eur J Cell Biol**, 73, n. 2, p. 114-123, 1997b.

CARRUTHERS, V. B.; TOMLEY, F. M. Microneme Proteins in Apicomplexans. *In*: BURLEIGH, B. A. e SOLDATI-FAVRE, D. (Ed.). **Molecular Mechanisms of Parasite Invasion: Subcellular Biochemistry**. New York, NY: Springer New York, 2008. p. 33-45.

ČERNOCKÁ, H.; ŘÍMÁNKOVÁ, L.; OSTATNÁ, V. Fetuin and asialofetuin at charged surfaces: Influence of sialic acid presence. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 902, p. 115801, 2021.

COOK, J. H.; UENO, N.; LODOEN, M. B. *Toxoplasma gondii* disrupts  $\beta$ 1 integrin signaling and focal adhesion formation during monocyte hypermotility. **Journal of Biological Chemistry**, 293, n. 9, p. 3374-3385, 2018.

COURRET, N.; DANCHE, S.; SONIGO, P.; MILON, G. v. *et al.* CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**, 107, n. 1, p. 309-316, 2006.

CUMMINGS, R. D.; CHIFFOLEAU, E.; VAN KYOOK, Y.; MCEVER, R. P. C-Type Lectins. *In*: VARKI, A.; CUMMINGS, R. D., *et al* (Ed.). **Essentials of Glycobiology**. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press

Copyright © 2022 The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California; published by Cold Spring Harbor Laboratory Press; doi:10.1101/glycobiology.4e.34. All rights reserved., 2022. p. 455-474.

DA GAMA, L. M.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; GUIMARÃES, U.; ARNHOLDT, A. C. V. Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection**, 6, n. 14, p. 1287-1296, 2004.

DARDÉ, M.-L.; MERCIER, A.; SU, C.; KHAN, A. *et al.* Chapter 3 - Molecular epidemiology and population structure of *Toxoplasma gondii*. *In*: WEISS, L. M. e KIM, K. (Ed.). **Toxoplasma gondii (Third Edition)**: Academic Press, 2020. p. 63-116.

DENG, Y.; REN, X.; YANG, L.; LIN, Y. *et al.* A JNK-Dependent Pathway Is Required for TNF $\alpha$ -Induced Apoptosis. **Cell**, 115, n. 1, p. 61-70, 2003.

DEROUIN, F.; PELLOUX, H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. **Clinical Microbiology and Infection**, 14, n. 12, p. 1089-1101, 2008.

DHANASEKARAN, D. N.; REDDY, E. P. JNK signaling in apoptosis. **Oncogene**, 27, n. 48, p. 6245-6251, 2008.

DUBEY, J. P. Chapter 1 - The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. *In*: WEISS, L. M. e KIM, K. (Ed.). **Toxoplasma gondii (Third Edition)**: Academic Press, 2020. p. 1-19.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.

DUBOIS, D. J.; SOLDATI-FAVRE, D. Biogenesis and secretion of micronemes in *Toxoplasma gondii*. 21, n. 5, p. e13018, 2019.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOYAMA, H.; OKAWA, K. *et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, 391, n. 6662, p. 43-50, 1998.



FAN, M.; CHAMBERS, T. C. Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. **Drug Resistance Updates**, 4, n. 4, p. 253-267, 2001/08/01/ 2001.

FARLEY, N.; PEDRAZA-ALVA, G.; SERRANO-GOMEZ, D.; NAGALEEKAR, V. *et al.* p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Mediates the Fas-Induced Mitochondrial Death Pathway in CD8+ T Cells. 26, n. 6, p. 2118-2129, 2006.

FOURMAUX, M. N.; ACHBAROU, A.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; BIDERRE, C. *et al.* The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 83, n. 2, p. 201-210, 1996.

FRIEDRICH, N.; SANTOS, J. M.; LIU, Y.; PALMA, A. S. *et al.* Members of a Novel Protein Family Containing Microneme Adhesive Repeat Domains Act as Sialic Acid-binding Lectins during Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites **Journal of Biological Chemistry**, 285, n. 3, p. 2064-2076, 2010.

FU, L.-l.; ZHOU, C.-c.; YAO, S.; YU, J.-y. *et al.* Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 43, n. 10, p. 1442-1449, 2011.

GIEFING-KRÖLL, C.; BERGER, P.; LEPPERDINGER, G.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. 14, n. 3, p. 309-321, 2015.

GREEN, D. R. The Coming Decade of Cell Death Research: Five Riddles. **Cell**, 177, n. 5, p. 1094-1107, 2019/05/16/ 2019.

GREEN, D. R. Caspase Activation and Inhibition. 14, n. 8, 2022a.

GREEN, D. R. The Death Receptor Pathway of Apoptosis. 14, n. 2, 2022b.

GREEN, D. R. A Matter of Life and Death. 14, n. 1, 2022c.

GRIFFITHS, G. D.; LEEK, M. D.; GEE, D. J. The toxic plant proteins ricin and abrin induce apoptotic changes in mammalian lymphoid tissues and intestine. 151, n. 3, p. 221-229, 1987.

HARPER, J. M.; HOFF, E. F.; CARRUTHERS, V. B. Multimerization of the *Toxoplasma gondii* MIC2 integrin-like A-domain is required for binding to heparin and human cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 134, n. 2, p. 201-212, 2004.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, 8, n. 10, p. 634-640, 2002.

JULIEN, O.; WELLS, J. A. Caspases and their substrates. **Cell Death & Differentiation**, 24, n. 8, p. 1380-1389, 2017/08/01 2017.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. **British Journal of Cancer**, 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

LAMBERT, H.; DELLACASA-LINDBERG, I.; BARRAGAN, A. Migratory responses of leukocytes infected with *Toxoplasma gondii*. **Microbes and Infection**, 13, n. 1, p. 96-102, 2011.

LIU, B.; ZHANG, B.; MIN, M.-w.; BIAN, H.-j. *et al.* Induction of apoptosis by *Polygonatum odoratum* lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 1790, n. 8, p. 840-844, 2009.

LIU, D.; WANG, S.; ZHANG, J.; XIAO, W. *et al.* Site-Specific N- and O-Glycosylation Analysis of Human Plasma Fibronectin. 9, 2021-June-15 2021. Original Research.

LIU, Q.; LI, F.-C.; ZHOU, C.-X.; ZHU, X.-Q. Research advances in interactions related to *Toxoplasma gondii* microneme proteins. **Experimental Parasitology**, 176, p. 89-98, 2017.

LOURENÇO, E. V.; PEREIRA, S. R.; FAÇA, V. M.; COELHO-CASTELO, A. A. M. *et al.* *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. **Glycobiology**, 11, n. 7, p. 541-547, 2001.

MADESH, M.; ANTONSSON, B.; SRINIVASULA, S. M.; ALNEMRI, E. S. *et al.* Rapid Kinetics of tBid-induced Cytochrome c and Smac/DIABLO Release and Mitochondrial Depolarization \*. **Journal of Biological Chemistry**, 277, n. 7, p. 5651-5659, 2002.

MARCHANT, J.; COWPER, B.; LIU, Y.; LAI, L. *et al.* Galactose Recognition by the Apicomplexan Parasite *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Biological Chemistry**, 287, n. 20, p. 16720-16733, 2012.

MAYERHOFER, P. U.; COOK, J. P.; WAHLMAN, J.; PINHEIRO, T. T. J. *et al.* Ricin A Chain Insertion into Endoplasmic Reticulum Membranes Is Triggered by a Temperature Increase to 37 °C. **Journal of Biological Chemistry**, 284, n. 15, p. 10232-10242, 2009.

MCAULEY, J. B. Congenital Toxoplasmosis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, 3, n. suppl\_1, p. S30-S35, 2014.

MEGLI, C. J.; COYNE, C. B. Infections at the maternal–fetal interface: an overview of pathogenesis and defence. **Nature Reviews Microbiology**, 20, n. 2, p. 67-82, 2022.

MENZIES, F. M.; MACPHAIL, D.; HENRIQUEZ, F. L. The role of chemokines and their receptors during protist parasite infections. **Parasitology**, 143, n. 14, p. 1890-1901, 2016.

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

MUNIZ-FELICIANO, L.; VAN GROL, J.; PORTILLO, J.-A. C.; LIEW, L. *et al.* Toxoplasma gondii-Induced Activation of EGFR Prevents Autophagy Protein-Mediated Killing of the Parasite. **PLOS Pathogens**, 9, n. 12, p. e1003809, 2013.

NAGATA, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. 36, n. 1, p. 489-517, 2018.

NASCIMENTO, A. P. M.; WOLIN, I. A. V.; WELTER, P. G.; HEINRICH, I. A. *et al.* Lectin from Dioclea violacea induces autophagy in U87 glioma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, 134, p. 660-672, 2019/08/01/ 2019.

OCHIENG, J.; LEITE-BROWNING, M. L.; WARFIELD, P. Regulation of Cellular Adhesion to Extracellular Matrix Proteins by Galectin-3. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 246, n. 3, p. 788-791, 1998.

ÓLAFSSON, E. B.; BARRAGAN, A. The unicellular eukaryotic parasite Toxoplasma gondii hijacks the migration machinery of mononuclear phagocytes to promote its dissemination. **Biology of the Cell**, n/a, n. n/a, 2020.

PARSHENKOV, A.; HENNET, T. Glycosylation-Dependent Induction of Programmed Cell Death in Murine Adenocarcinoma Cells. 13, 2022. Original Research.

PHILLIPS, A. N.; ANTUNES, F.; STERGIOUS, G.; RANKI, A. *et al.* A sex comparison of rates of new AIDS-defining disease and death in 2554 AIDS cases. **AIDS**, 8, n. 6, p. 831-836, 1994.

REISS, M.; VIEBIG, N.; BRECHT, S.; FOURMAUX, M.-N. *et al.* Identification and Characterization of an Escorter for Two Secretory Adhesins in Toxoplasma gondii. **Journal of Cell Biology**, 152, n. 3, p. 563-578, 2001.

ROBERTS, C. W.; CRUICKSHANK, S. M.; ALEXANDER, J. Sex-determined resistance to Toxoplasma gondii is associated with temporal differences in cytokine production. **Infection and Immunity**, 63, n. 7, p. 2549-2555, 1995.

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

SAOUROS, S.; EDWARDS-JONES, B.; REISS, M.; SAWMYNADEN, K. *et al.* A Novel Galectin-like Domain from Toxoplasma gondii Micronemal Protein 1 Assists the Folding, Assembly, and Transport of a Cell Adhesion Complex\*. **Journal of Biological Chemistry**, 280, n. 46, p. 38583-38591, 2005/11/18/ 2005.

- SARDINHA-SILVA, A.; MENDONÇA-NATIVIDADE, F. C.; PINZAN, C. F.; LOPES, C. D. *et al.* The lectin-specific activity of *Toxoplasma gondii* microneme proteins 1 and 4 binds Toll-like receptor 2 and 4 N-glycans to regulate innate immune priming. **PLOS Pathogens**, 15, n. 6, p. e1007871, 2019.
- SCHWARTZMAN, J. D.; SAFFER, L. D. How *Toxoplasma gondii* Gets In and Out of Host Cells. *In*: AVILA, J. L. e HARRIS, J. R. (Ed.). **Intracellular Parasites**. Boston, MA: Springer US, 1992. p. 333-364.
- SHI, Z.; LI, W.-w.; TANG, Y.; CHENG, L.-j. A Novel Molecular Model of Plant Lectin-Induced Programmed Cell Death in Cancer. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 40, n. 10, p. 1625-1629, 2017.
- SINGH, R.; NAWALE, L.; SARKAR, D.; SURESH, C. G. Two Chitotriose-Specific Lectins Show Anti-Angiogenesis, Induces Caspase-9-Mediated Apoptosis and Early Arrest of Pancreatic Tumor Cell Cycle. **PLOS ONE**, 11, n. 1, p. e0146110, 2016.
- SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, 31, n. 12, p. 1293-1302, 2001.
- TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 11, n. 9, p. 621-632, 2010.
- TATSUTA, T.; HOSONO, M.; SUGAWARA, S.; KARIYA, Y. *et al.* Sialic acid-binding lectin (Ic3yme) induces caspase-dependent apoptosis-mediated mitochondrial perturbation in Jurkat cells. **International journal of oncology**, 43, n. 5, p. 1402-1412, 2013.
- TEN HOEVE, A. L.; BRAUN, L.; RODRIGUEZ, M. E.; OLIVERA, G. C. *et al.* The *Toxoplasma* effector GRA28 promotes parasite dissemination by inducing dendritic cell-like migratory properties in infected macrophages. **Cell Host & Microbe**, 30, n. 11, p. 1570-1588.e1577, 2022.
- TSANEVA, M.; VAN DAMME, E. J. M. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate Journal**, 37, n. 5, p. 533-551, 2020.
- TUMMERS, B.; GREEN, D. R. Caspase-8: regulating life and death. 277, n. 1, p. 76-89, 2017.
- UENO, N.; LODOEN, M. B. From the blood to the brain: avenues of eukaryotic pathogen dissemination to the central nervous system. **Current Opinion in Microbiology**, 26, p. 53-59, 2015.
- WALKER, W.; ROBERTS, C. W.; FERGUSON, D. J.; JEBBARI, H. *et al.* Innate immunity to *Toxoplasma gondii* is influenced by gender and is associated with differences in interleukin-12 and gamma interferon production. **Infection and Immunity**, 65, n. 3, p. 1119-1121, 1997.

WANG, H.; NG, T. B.; OOI, V. E. C.; LIU, W. K. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 32, n. 3, p. 365-372, 2000.

WESSELBORG, S.; KABELITZ, D. Activation-Driven Death of Human T Cell Clones: Time Course Kinetics of the Induction of Cell Shrinkage, DNA Fragmentation, and Cell Death. **Cellular Immunology**, 148, n. 1, p. 234-241, 1993.

WONG, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, 30, n. 1, p. 87, 2011.

YUE, J.; LÓPEZ, J. M. Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. 21, n. 7, p. 2346, 2020.

ZHU, J.; WANG, Y.; CAO, Y.; SHEN, J. *et al.* Diverse Roles of TgMIC1/4/6 in the Toxoplasma Infection. 12, 2021. Review.

## Figures legends

**Figure 1: Recombinant micronemal 1 and 4 of *T. gondii* interferes with the interaction of THP1 Fibronectin.** THP1 cells were evaluated to attachment to fibronectin in various conditions using a plate binding colorimetric assay. In all conditions, cells were cultured for 16 h in presence of 50 ng/mL of PMA. In figures **A** and **B**, coated wells were incubated with different concentration of rMIC1 and rMIC4 for 1 hour after the settled THP1 cells. **C** and **D** plates coated with fibronectin were incubated with different concentrations of rMIC1 and rMIC4, next the wells were washed with PBS and the cells were cultured. **E** and **F** cells were plated at the same time with different concentrations of rMIC1 or rMIC4. **G** and **H** THP1 cells were incubated for 1 hour, then the cells were stimulated with different concentrations of rMIC1 or rMIC4. At the end of the assay, cells were fixed in 4,0% formaldehyde for 40 minutes next the cells were washed with PBS then stained with 0,1% crystal violet for 40 minutes. Stained cells were subsequently solubilized in 10% acetic acid, and adhesion was quantified by measuring the absorbance of the wells at 540 nm. Graphs show mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using a ANOVA followed by Bonferroni post-test.  $P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$ .

**Figure 2: Fibronectin is recognized by recombinant microneme and interferes in the THP1 cells interaction with fibronectin.** **A-** Plate coated with 30 $\mu$ g/mL of fibronectin were incubated with 20 $\mu$ g/mL of rMIC1 or rMIC4 overnight. Next, the plates were incubated with anti-rMIC1 IgY, anti-rMIC4 IgY, or PBS for 2 hours. The reaction was detected with 1:4,000 peroxidase-conjugated rabbit anti-chicken IgY. Plates were read in 450nm. **B-C-** Plates coated with 50 $\mu$ g/mL fibronectin were incubated with 5 $\mu$ g/mL of rMIC1 and rMIC4, in presence or not of fetuin and asialofetuin. After 1 hour, the fibronectin-coated wells were washed with PBS and the THP1 cells were seated for 24 hours. At the end of the assay, cells were fixed in 4% formaldehyde for 40 minutes and washed with PBS. The cells were stained with 0,1% crystal violet for 40 minutes, solubilized in 10% acetic acid, and adhesion was quantified by measuring the absorbance of the wells at 540 nm. Bars represent means  $\pm$  SEM of three independent experiments. Statistical analysis was performed using a ANOVA followed by Bonferroni post-test (**A**) and test t students (**B-C**).  $P < *0,05$ ,  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$ .

**Figure 3: rMICs directly modulate the affinity of THP1 cells to fibronectin and this is apparently independent of CD29 cell surface expression.** **A-B-** TA susHP1 cells at the density were stimulated with 5 $\mu$ g/mL of rMIC1 or rMIC4 for 15,30 and 60 minutes. Next, the cells were allowed to settled in wells coated with 50 $\mu$ g/mL fibronectin for 24 hours. The detection of monocytic cells interaction to fibronectin (**A-B**) were performed by fixing the cells with 4,0% formaldehyde for 40 minutes. The wells were washed with PBS and then stained with 0,1% crystal violet for 40 minutes. Stained cells were subsequently solubilized in 10% acetic acid, and adhesion was quantified by measuring the absorbance of the wells at 540 nm. **E-** A suspension of  $3,0 \times 10^5$  cells/mL of THP1 cells with 5  $\mu$ g/mL of rMIC1 and rMIC4 for 15 minutes. After that the cells were fixed with 4,0% formaldehyde for 50 minutes The cells were washed with PBS and then blocking with Fc blocking for 1 hora at room temperature. The cells were washed and staining with CD29 for 1 hour. Next, the cells were washed in PBS and acquired in Guava Cytometer. The data were analyzing using the FlowJow software. Graphs show mean  $\pm$  SEM. Statistical

analysis was performed using a ANOVA followed by Bonferroni post-test  $P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$ .

**Figure 4. rMIC1 and rMIC4 do not induce chemotaxis of THP1 cells.** THP1 cells were seeded at density of  $4,5 \times 10^5$  cells/mL in the upper chamber of transwells containing polycarbonate membranes with 8- $\mu$ m pores. In the lower chamber was added  $5 \mu\text{g/mL}$  of rMIC1 or rMIC4. MCP-1 at  $20 \text{ng/mL}$  was used as the positive control (CTL+) and PBS as negative one (medium). The cells were allowed to migrate for 4 hours, the upper chamber were removed and the number of migrated cells were counted by using Neubauer hemocytometer. Graphs show mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using a ANOVA followed by Bonferroni post-test  $P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$ .

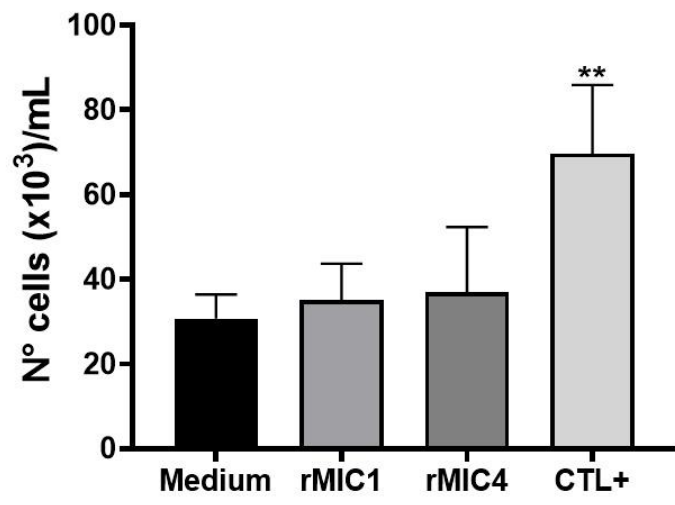
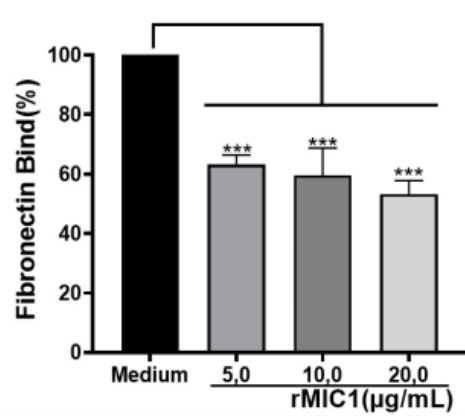
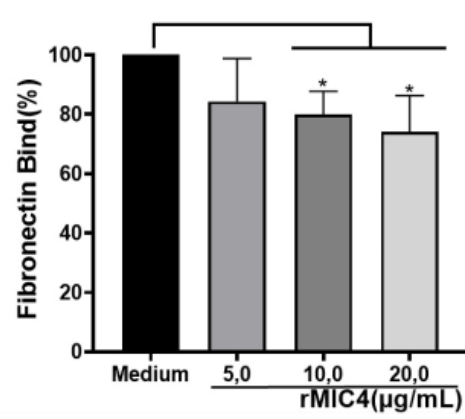
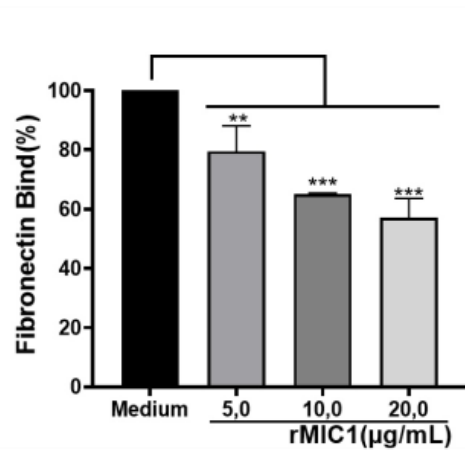
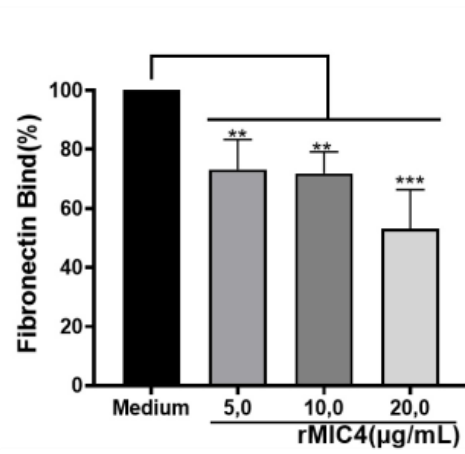
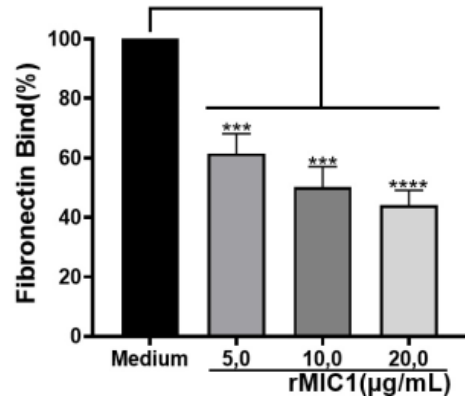
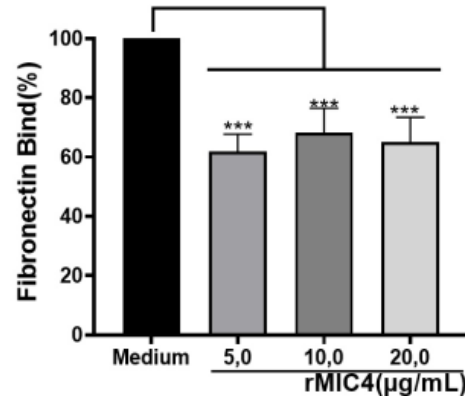


Figure 1



**A****B****C****D****E****F****Figure 2**

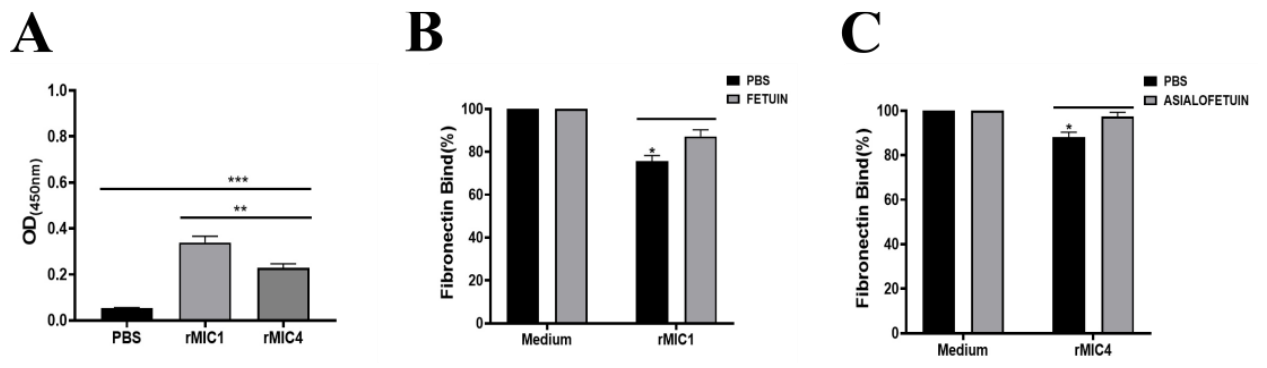


Figure 3

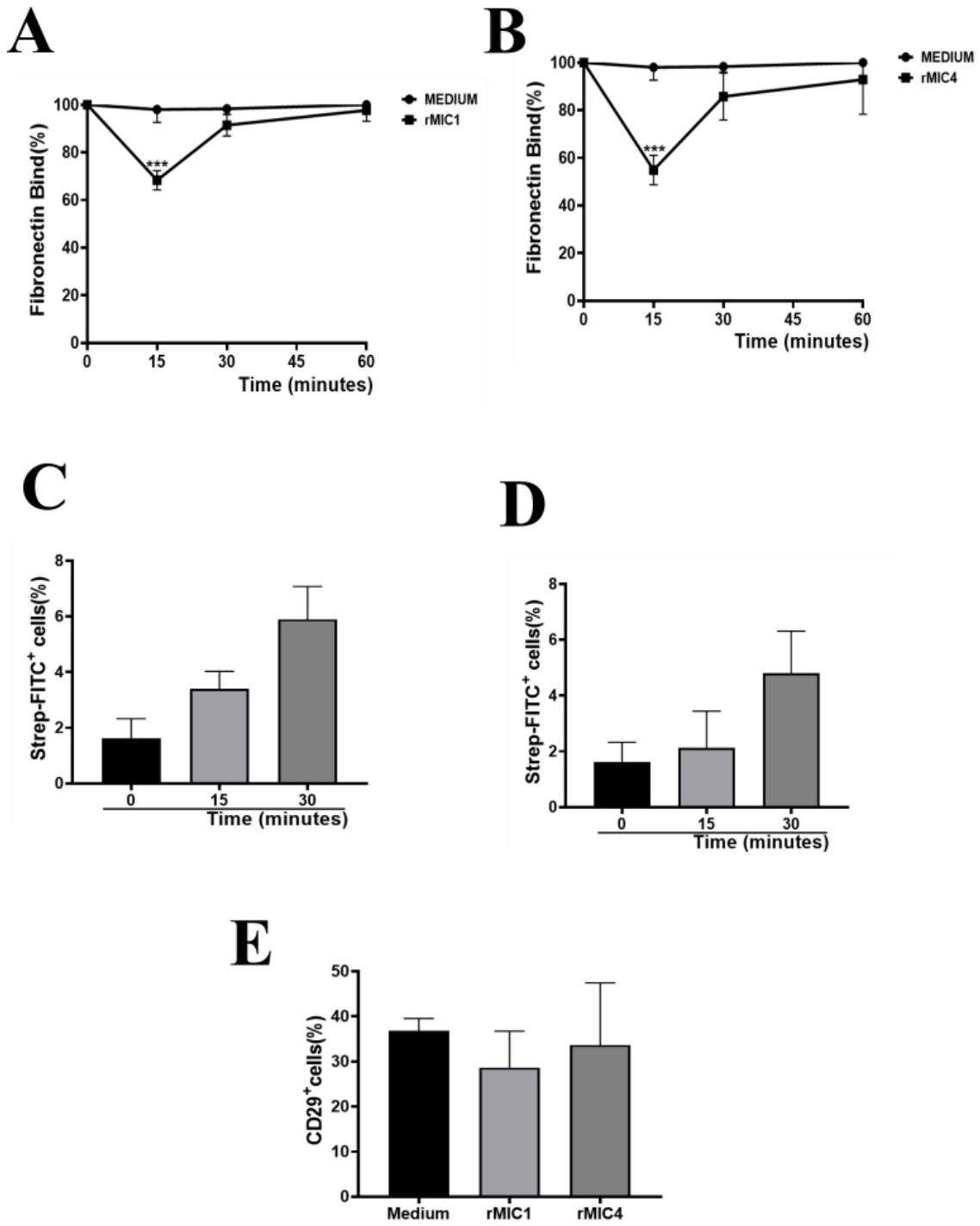


Figure 4