UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

HUGO SILVA PIRES

AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Toxoplasma gondii* DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

BELO HORIZONTE

MAIO – 2020

Hugo Silva Pires

AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*Toxoplasma gondii* DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia
Orientação: Érica dos Santos Martins Duarte
Coorientação: Mariana Torquato Quezado de Magalhães

BELO HORIZONTE

MAIO – 2020

043 Pires, Hugo Silva.
Avaliação e caracterização da atividade anti-Toxoplasma gondii de peptídeos bioativos [manuscrito] / Hugo Silva Pires. – 2020.
74 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Érica dos Santos Martins Duarte. Coorientador: Dr. Mariana Torquato Quezado de Magalhães.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Toxoplasma /terapia. 3. Peptídeos Catiônicos Antimicrobianos. I. Duarte, Érica dos Santos Martins. II. Magalhães, Mariana Torquato Quezado de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis – CRB 6 - 2680

Universidade Federal de Minas Gerais

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia

413/2020/11
entrada
1º/2018
2018653657

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Hugo Silva Pires

Às **nove horas e trinta minutos** do dia **19 de maio do ano de 2020**, reuniu-se, por videoconferência, sala https://conferenciaweb.rnp.br/webconf/daniella-castanheira-bartholomeu, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **"Avaliação e caracterização da atividade anti-*Toxoplasma gondii* de peptídeos bioativos"** área de concentração: **Protozoologia.** Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Profa. Dra. Érica dos Santos Martins Duarte,** após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(a) candidato(a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Érica dos Santos Martins Duarte	UFMG	Aprovado
Dra. Érika Martins Braga	UFMG	Aprovado
Dr. Thiago de Castro Gomes	UFMG	Aprovado
Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães	UFMG	Aprovado

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	

Pelas indicações, o(a) candidato(a) foi considerado(a): APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada digitalmente por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 19 de maio de 2020.

Dra. Erica Martins Duarte _____
(Orientador)

Dra. Érika Martins Braga _____

Dr. Thiago de Castro Gomes _____

Dra. Mariana Torquado Quezado de Magalhães _____

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Profa. Hélida Monteiro de Andrade
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Parasitologia
ICB-UFMG - Port:7104-04/10/202
SIAPE nº 2167747

Ata-COVID19- período isolamento social

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS

- **Laboratório de Quimioterapia de Protozoários Egler Chiari**
  - Dra. Érica dos Santos Martins Duarte

- **Laboratório de Veneno e Toxicologia**
  - Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães

APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
Pró-reitoria de Pesquisa UFMG (PRPq-UFMG)

DEDICATÓRIA

Todas as coisas, na vida, passam…
Os dias de dificuldades, passarão…
Passarão também os dias de amargura e solidão…
As dores e as lágrimas passarão.
As frustrações que nos fazem chorar… um dia passarão.
A saudade passará.
Dias de tristeza… Dias de felicidade…
São lições necessárias que passam deixando no espírito as experiências acumuladas.
Se hoje, para nós, é um desses dias repletos de amargura, paremos um instante.
Elevemos o pensamento ao Alto, e busquemos a voz suave da Mãe amorosa a nos dizer carinhosamente: isso também passará…
E guardemos a certeza, pelas próprias dificuldades já superadas, que não há mal que dure para sempre.

- Emmanuel

A todos aqueles que já tiveram um momento de fraqueza.
Não vai doer pra sempre, então não deixe isso
afetar o que há de melhor em você.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças para acreditar que tudo pode dar certo.

Um agradecimento especial à minha orientadora Dra Érica dos Santos Martins Duarte, pela amizade, confiança e por toda a atenção que me foi dada.

Agradeço minha mãe por todo amor.

A minha irmã pelo exemplo de perseverança.

Aos familiares que podem compartilhar este momento comigo e principalmente àqueles que não podem.

Aos professores Marcos Horácio Pereira e José Emílio Zanzirolani de Oliveira por todo apoio e convívio, pela amizade e pelas inúmeras vezes que conseguiram me enxergar melhor do que sou.

A minha turma de mestrado, por todo companheirismo e momentos de descontração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, professores e funcionários.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Começar é sempre a parte mais difícil. É como gaguejar.
Você só tem medo no início. É onde o medo está.
Então você só ga-ga-gagueja no início de uma palavra.
Quando está co-co-co-começando. Ninguém jamais gagueja no final.
Não existe gagueira-ra-ra. Porque já é tarde para ter medo.
Aí restam apenas os arrependimentos.

– *Autor desconhecido*

RESUMO

O protozoário zoonótico *Toxoplasma gondii* é o agente etiológico da toxoplasmose, uma doença cosmopolita que atinge um terço da população mundial. Para a maioria dos indivíduos imunocompetentes a toxoplasmose se manifesta de forma variável. Neste grupo, as manifestações clínicas quando presentes, pode ocorrer um quadro polissintomático, como febre, linfadenoparia, comprometimento ganglionar, mialgia, uveíte e coriorretinite, onde a gravidade das manifestações dependerão principalmente da imunidade protetora do hospedeiro e do tipo de cepa do parasito. Dentro do grupo de risco, a forma mais grave é encontrada em crianças recém-nascidas, sendo caracterizada por lesões necróticas e inflamatórias que podem levar a sequelas neurológicas podendo causar corioretinite, encefalite e hidrocefalia. Além disso, a toxoplasmose apresenta quadro grave de evolução em indivíduos com o sistema imune comprometido (receptores de órgãos, indivíduos em tratamento quimioterápico e portadores de HIV). As terapias atualmente disponíveis para o tratamento da toxoplasmose apresentam eficácia limitada, exigem cursos prolongados e demonstram toxicidade significativa com graves efeitos colaterais nos indivíduos. Neste aspecto, torna-se indispensável a concentração de esforços para a busca de novas terapias que sejam mais eficazes contra o *T. gondii* e menos tóxicas ao hospedeiro. Pensando nessa perspectiva surgem os peptídeos antimicrobianos (AMPs). Tratam-se de moléculas constituintes da imunidade inata ou como produtos do metabolismo secundário de diferentes organismos (bactérias, fungos, plantas, insetos, peixes, anfíbios, aracnídeos e mamíferos) ou unicelulares, podendo ser expressos de forma constitutiva ou induzida. Os AMPs não dependem da interação com um receptor específico, tornando-os opções terapêuticas alternativas com relação aos antibióticos encontrados disponíveis comercialmente. Neste contexto, este trabalho abordou o uso potencial de diferentes peptídeos bioativos pertencentes a família das fenilseptinas, licotoxicina e surfactina como nova fonte terapêutica contra o *T. gondii*. Para tanto, foram realizados testes de citotoxicidade celular utilizando fibroblastos neonatais humanos NDHF, pelo método colorimétrico do MTS. A atividade anti-*T. gondii* foi avaliada por meio de ensaios de invasão, proliferação e de pré-tratamento de células NDHF utilizando parasitos da cepa RH de *T. gondii*. Em primeiro momento realizado o ensaio de citotoxicidade em células NDHF. Demonstraram toxicidade significativa concentrações superiores a 100 µg/ml de D-Phes e L-Phes, enquanto que para LyeTx e Surfactina concentrações acima de 12 µg/ml e 57,4 µg/ml, respectivamente, já foram tóxicas. As maiores concentrações não tóxicas dos peptídeos foram então utilizadas nas etapas subsequentes: Resultados obtidos após o tratamento de taquizoítos de *T. gondii* intracelulares com as maiores concentrações não tóxicas testadas mostraram que 100 µg/ml de D-Phes e L-Phes inibiram a proliferação em 36,56% e 28,1%, respectivamente; Já 3 µg/ml de LyeTx e 28,7 µg/ml de Surfactina inibiram a proliferação em 75,48% e 80,4%, respectivamente. Os ensaios do efeito do tratamento na invasão de parasitos pela célula hospedeira mostraram redução de 43,24 %, 50,8 %, 23,8 % e 53,3 % na invasão após incubação com 100 µg/ml de D-Phes e L-Phes, 3 µg/ml de LyeTx1 e 28,7 µg/ml de surfactina, respectivamente. Análises por microscopia óptica novamente mostraram que o tratamento com 100 µg/ml de D-Phes inibiu de forma significativa a invasão de *T. gondii*, reduzindo em cerca de 70 % o número de células infectadas em relação ao controle. Nossos resultados mostram que os AMPs podem ser alternativas promissoras ao desenvolvimento de novas terapias para a toxoplasmose.

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*, tratamento, peptídeos antimicrobianos

ABSTRACT

The zoonotic protozoan *Toxoplasma gondii* is the etiologic agent of toxoplasmosis, a cosmopolitan disease that affects one third of the world population. For most immunocompetent individuals, toxoplasmosis manifests itself in a variable way. In this group, the clinical manifestations, when present, may show a polysymptomatic condition, with fever, lymphadenopathy, ganglion involvement, myalgia, uveitis and chorioretinitis, where the severity of the manifestations will depend mainly on the host's protective immunity and the type of parasite strain. Within the risk group, the most severe form is found in newborn children, being characterized by necrotic and inflammatory lesions that can lead to neurological sequelae and can cause chorioretinitis, encephalitis and hydrocephalus. In addition, toxoplasmosis has a severe evolution in individuals with compromised immune systems (organ recipients, individuals undergoing chemotherapy and HIV). The therapies currently available for the treatment of toxoplasmosis have limited efficacy, require prolonged courses and demonstrate significant toxicity with serious side effects in individuals. In this regard, it is essential to concentrate efforts to search for new therapies that are more effective against *T. gondii* and less toxic to the host. Thinking about this perspective, antimicrobial peptides (AMPs) appear. These are molecules that make up the innate immunity of multicellular organisms (fungi, plants, insects, fish, amphibians, arachnids and mammals) and can be expressed constitutively, induced or as products of secondary metabolism. AMPs do not depend on interaction with a specific receptor, making them alternative therapeutic options with respect to antibiotics found commercially available. In this context, this work addressed the potential use of different bioactive peptides belonging to the family of phenylseptins, lycotoxin and surfactin as a new therapeutic source against *T. gondii*. For this purpose, cell cytotoxicity tests were carried out in NDHF neonatal human fibroblasts using the MTS colorimetric method. Activity Anti-*T gondii* was evaluated by means of invasion, proliferation and pretreatment tests of NDHF cells using parasites of the RH strain of *T. gondii*. Firstly, the cytotoxicity test was performed on NDHF cells. Concentrations greater than 100 µg /ml of D-Phes and L-Phes have shown significant toxicity, whereas for LyeTx and Surfactina concentrations above 12 µg/ml and 57.4 µg/ml, respectively, have already been toxic. The highest non-toxic concentrations of the peptides were then used in the subsequent steps: Results obtained after the treatment of intracellular *T. gondii* tachyzoites with the highest tested non-toxic concentrations showed that 100 µg/ml of D-Phes and L-Phes inhibited proliferation in 36.56 % and 28.1 %, respectively; 3 µg/ml LyeTx and 28.7 µg/ml Surfactin inhibited proliferation by 75.48 % and 80.4 %, respectively. The tests of the effect of the treatment on the invasion of parasites by the host cell showed a reduction of 43.24%, 50.8 %, 23.8 % and 53.3% in the invasion after incubation with 100 µg/ml of D-Phes and L-Phes, 3 µg/ml of LyeTx and 28.7 µg/ml of surfactin, respectively. Analyzes by optical microscopy again showed that treatment with 100 µg/ml of D-Phes significantly inhibited the invasion of *T. gondii*, reducing the number of infected cells by about 70% compared to the control. Our results show that AMPs could be an alternative to developing new therapies for toxoplasmosis.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, treatment, antimicrobial peptides

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Status global de soroprevalência de *Toxoplasma gondii* no mundo.....15
Figura 2– Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*.....17
Figura 3 – Morfologia geral da forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*.....20
Figura 4 – Ciclo lítico da invasão, replicação e egresso do *Toxoplasma gondii* na célula hospedeira.....20
Figura 5 – Morfologia das formas de resistência no hospedeiro e no ambiente de *Toxoplasma gondii*.....21
Figura 6 – Quatro classes de AMPs.....32
Figura 7 – Ação biológica dos peptídeos antimicrobianos 34
Figura 8: Modelos de mecanismos de ação propostos para a permeabilização de membranas celulares por AMPs.....36
Figura 9 – Efeito citotóxico da surfatina, litotoxina e das fenilseptinas em cultura de fibroblastos humano (NDHF) após 96h de tratamento.....47
Figura 10 – Efeito antiproliferativo de D-phes, L-phes, Surfactina e Lyetx em taquizoítas de *T. gondii*, em células NDHF após 24 h de tratamento.....48
Figura 11 – Efeito dos peptídeos na interação de taquizoítos com a célula hospedeira.....50
Figura 12 – Efeito na invasão após o pré-tratamento da célula hospedeira por 24 h com os peptídeos.....51
Figura 13 – Efeito na invasão após o pré-tratamento de taquizoítos por 2h.....52
Figura 14 – Efeito no desenvolvimento intracelular de taquizoítos pré-tratados com os peptídios D-Phes, Lyetx e Surfactina.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações utilizadas no ensaio de citotoxicidade em células NDHF……46
Tabela 2 – AMP's isolados de diferentes organismos com atividade contra *T. gondii*.....57

LISTAS DE ABREVIAÇÕES

AMP's – Peptídeos antimicrobianos

ANOVA – Análise de Variância

BA – Bahia

DC – Células dendríticas

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA – Ensaio imunoenzimático

HAI – Ensaio de Hemaglutinação Indireta

HIV – Virús da imunodeficiência humana

LPS – Lipopolissacarideos

LTA – Ácido lipoteicóico

ML – Mililitros

MTS – Madison

NDHF – Normal Dermal Human Fibroblast

Pamps – Padrões moleculares associados a patógenos

PBS – Tampão fosfato-salino

PCR – Polimerase Chain Reaction

PMS – Promega

PR – Paraná

PYR – Pirimetamina

RIFI – Reação de Imunofluorescencia Indireta

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécie reativa de oxigênio

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

RS – Rio Grande do Sul

SDZ – Sulfadiazina

SFB – Soro Fetal Bovino

SNC – Sistema Nervoso Central

SP – São Paulo

TC – Toxoplasmose congênita

TLR – Tool Like Receptor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
   1.1. Aspectos epidemiológicos e biológicos de *T. gondii* 15
   1.2. Estágios evolutivos do *T. gondii* 19
   1.3. Patogenia e Virulência 23
   1.4. Diagnóstico 28
   1.5 Tratamento 28
   1.6 Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) 32
2. JUSTIFICATIVA 38
3. OBJETIVOS 39
   3.1. Objetivo geral 39
   3.2. Objetivos específicos 39
4. MATERIAIS E MÉTODOS 40
   4.1 Peptídeos utilizados 40
   4.2 Cultivo e manutenção de células NDHF 40
   4.3 Manutenção da cepa RH de *Toxoplasma gondii* 40
   4.4 Ensaio de citotoxicidade 41
   4.5 Ensaio de proliferação celular 42
   4.6 Ensaio de invasão celular parasito-célula 43
   4.7 Ensaio do pré-tratamento de taquizoítos extracelulares e invasão celular 44
   4.8 Ensaio do pré-tratamento de células NDHF e invasão 45
   4.9 Cálculos 45
5. RESULTADOS 46
   5.1. Avaliação da citotoxicidade em células NDHF 46
   5.2. Efeito antiproliferativo de peptídeos em taquizoítas da cepa RH 47
   5.3 Efeito dos peptídeos antimicrobianos na invasão pelo *T. gondii* 48
6. DISCUSSÃO 54
7. CONCLUSÕES 61
REFERÊNCIAS 62

1. INTRODUÇÃO

A maioria das doenças infecciosas emergentes em humanos são zoonoses (Jones *et al.*, 2008; Gebreyes *et al.*, 2014). Entre esses patógenos, o protozoário zoonótico *Toxoplasma gondii* (Nicole e Manceaux, 1909), pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Subordem Eimeriina, Família Sarcocystidae e Gênero *Toxoplasma*, é talvez o parasito mais amplamente distribuído no mundo (Flegr *et al.*, 2014; Krueguer *et al*., 2014) e é de inestimada importância médica e veterinária. O *T. gondii* é o agente etiológico da toxoplasmose, um parasito intracelular obrigatório que pode infectar qualquer animal de sangue quente (aves e mamíferos), incluindo o homem (Montoya e Liesenfeld, 2004; Tenter, 2009). Já os felídeos são os hospedeiros definitivos, também chamado de hospedeiros completos, enquanto aves e outros mamíferos são os hospedeiros intermediários (Robert-Gangneux e Dardé, 2012; Dubey *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2013).

1.1. Aspectos epidemiológicos e biológicos de *T. gondii*

É estimado que pelo menos um terço da população mundial esteja cronicamente infectada pelo *T. gondii* (Figura 1). Em alguns países a taxa real de soroprevalência pode ser superior a 50%, dependendo do grau de exposição ao parasito (Dubey e Beattie, 1988; Tenter *et al.*, 2000). O Brasil apresenta elevada taxa de infecção por *T gondii*. Já foi mostrado que no país, 60-80% da população adulta possui anticorpos para *T. gondii* (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003; Pappas e Russos, 2009; Furtado *et al.*, 2011; Nasr *et al.*, 2016). Dados revelam ainda que a prevalência sorológica de toxoplasmose no Brasil varia de 20% a 90% em diferentes estados (Neto *et al.*, 2010; Alday e Dogget, 2017).

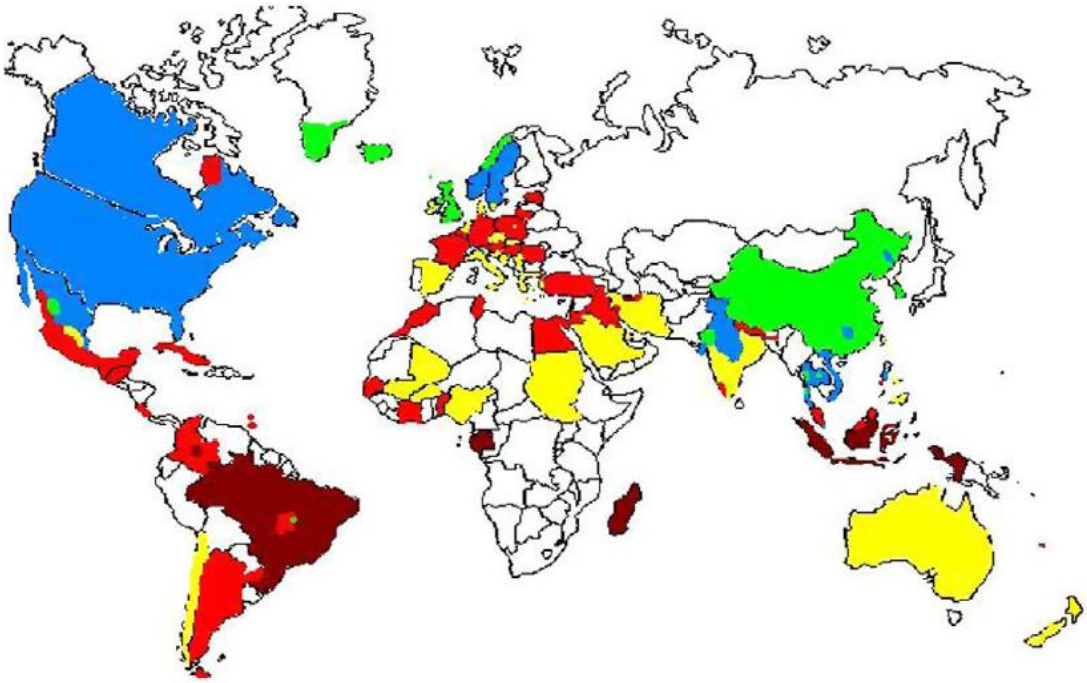

Figura. 1: Status global de soroprevalência de *Toxoplasma gondii*. Vermelho escuro indica soroprevalência superior a 60 %; vermelho claro 40-60 %; amarelo 20-40 %, azul 10-20 % e verde indica soroprevalência inferior a 10%. Branco refere-se a ausência de dados (Pappas e Russos, 2009).

Um levantamento sorológico avaliando a distribuição de toxoplasmose congênita, foi realizado por Neto e col., (2010), mostrando maior prevalência em estados de clima quente, tais como Pará, Rondônia, Mato Grosso e Maranhão. Um levantamento sorológico mais recente foi realizado por Araújo e col., (2018), na população rural da cidade de Pelotas, RS, demonstrou uma soroprevalência de 53,2 % para *T. gondii*. Taxa de soropositividade semelhante para toxoplasmose (56,7 %), foi encontrada em um estudo realizado em populações ribeirinhas do Amazonas (Vitaliano *et al.*, 2015). Em Salvador, BA foi observado que 51 % das gestantes eram soropositivas para *T. gondii* (Avelar *et al.*, 2017). Já um estudo realizado por Passos e col., (2018) em Cassia dos Coqueiros (SP) constatou que, de 970 indivíduos avaliados, 62,3 % demonstraram-se sororeagentes à *T. gondii*.

Dessa maneira, os dados da soroprevalência da toxoplasmose variam consideravelmente entre diferentes países, entre diferentes áreas geográficas do mesmo país e entre diferentes comunidades da mesma região (Pappas e Roussos, 2009; Robert-Gangneux e Dardé, 2012; Alday e Doggett, 2017). Essas variações são determinadas por fatores sociais,

ambientais, culturais, localização geográfica e também aos tipos de amostras biológicas e ensaios de diagnósticos que são utilizados (Tenter *et al.,* 2000; Petersen *et al.,* 2009; Robert-Gangneux e Dardé, 2012; Flerg *et al.,* 2014).

Por se tratar de um parasito do tipo heteroxênico o *T. gondii* possui um ciclo de vida complexo onde seu desenvolvimento ocorre em duas fases distintas: sexuada e assexuada (Figura 2). Hutchison (1965), biólogo da Universidade de Strathclyde, em Glasgow, descobriu que a infectividade de *T. gondii* era associada às fezes de gatos. Mais tarde, Dubey e Frenkel (1972) observaram e descreveram a morfologia e biologia do ciclo sexuado (ou coccidiano) e assexuado do parasito nos enterócitos do intestino de felídeos, hospedeiros definitivos. O desenvolvimento do ciclo no felino ocorre uma fase reprodutiva denominada merogonia, onde merontes são gerados assexuadamente dentro da célula hospedeira. As intensas multiplicações dos merontes, a célula hospedeira se rompe liberando os merontes ao meio extracelular e invadirão novas células dando início ao ciclo sexuado, denominado gametogonia. Como produto da gametogonia, os gamontes darão origem aos gametas masculinos e femininos, o microgameta e macrogameta, respectivamente. O microgameta que é móvel, se movimenta até uma célula que contenha o macrogameta, que é imóvel, e assim, realizará a fecundação. O resultado da fecundação é a formação do zigoto, o qual evoluirá dentro do epitélio através da produção de uma parede externa dupla, formando o oocisto (Dubey, 1977; Kawazoe e Mineo, 2011; Prado *et al.,* 2011). Os oocistos então ao romperem a célula parasitada são eliminados imaturos (não-esporulados) junto as fezes no ambiente. Após um processo denominado esporulação, desenvolvem em seu interior dois esporocistos contendo em cada um quatro esporozoítos. O oocisto esporulado é a forma infectante e pode permanecer viável no ambiente por até um ano. Os felídeos, quando em fase aguda da infecção podem eliminar cerca de 100 milhões de oocistos no ambiente (Innes *et al.,* 2009; Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

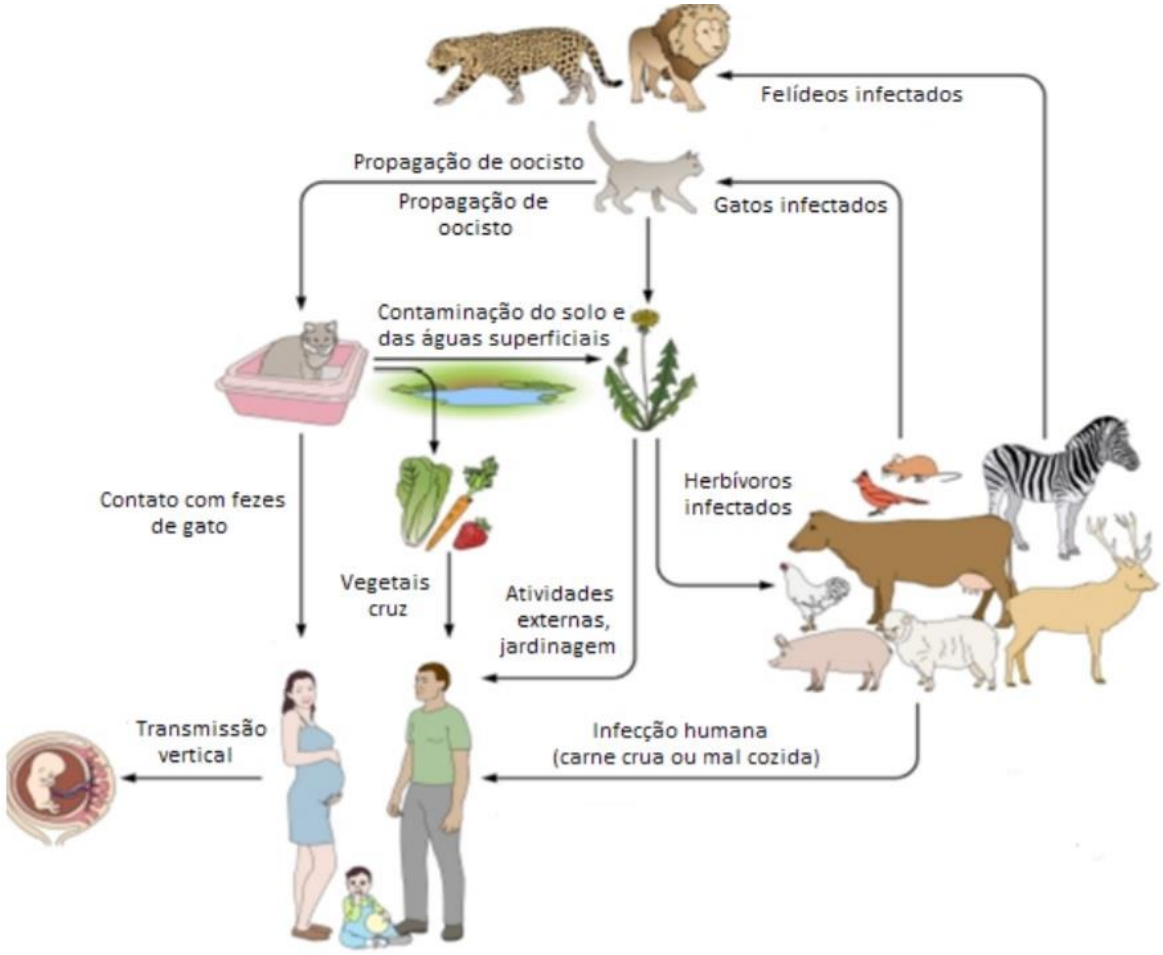

Figura 2: Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii* (Adaptado de Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

Além da infecção do *T. gondii* pela ingestão de oocistos esporulados (infectantes) presentes na água e em alimentos, os hospedeiros suscetíveis também podem adquirir a infecção através do consumo de carne crua ou malpassada dos hospedeiros infectados, principalmente de suínos e caprinos contendo cistos teciduais com bradizoítas viáveis (Petersen *et al.*, 2009), pela recrudescência da infecção por um determinado quadro de imuno-comprometimento (Kawazoe e Mineo, 2011; Ferreira *et al.*, 2013), por via passagem transplacentária de taquizoítos que pode ocorrer na primo-infecção de gestantes em fase aguda (Kimball, *et al.*, 1971; Desmonts e Couvreur, 1974; Stray-Pedersen, 1980; Elmore *et al.*, 2010). Formas de transmissão do *T. gondii* mais raramente observadas nos indivíduos podem ocorrer pelo transplante de órgãos (Slavin *et al.*, 1994) transfusão de sangue (Siegel *et al.*, 1971) e acidentes com material biológico (Field *et al.*, 1972; Herwaldt, 2001).

Surtos de Toxoplasmose em humanos em áreas endêmicas tem sido associado principalmente a recursos hídricos contaminados (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003; De Moura *et al.*, 2006). A importância epidemiológica e o potencial do oocisto para a transmissão de *T. gondii* por recursos hídricos fica evidente na ocorrência de surtos como o de 2002, no município de Santa Isabel do Ivaí (PR), onde 426 pessoas apresentaram sorologia positiva de infecção aguda por *T. gondii* (IgM). Mais recentemente foi publicado um relatório de investigação de surto de toxoplasmose pela Superintendência de Vigilância Sanitária do governo estadual do Rio Grande do Sul (Lemos, 2018), no município de Santa Maria, RS. As informações disponíveis indicam tratar-se do maior surto já registrado no mundo: mais de 900 pessoas apresentaram sorologia positiva da infecção por *T. gondii*. Além disso surtos da doença devido a ingestão de carne contaminada também são reportados (Choi *et al.*, 1997; Mead *et al.*, 1999; Dawson 2005). Dessa forma, dentre todos os meios de contaminação, a veiculação hídrica é evidenciada como uma das mais importantes fontes de infecção, uma vez que os oocistos resistem viáveis por longos períodos no ambiente aquático e também à ação produtos empregados como desinfetantes químicos pelas empresas de abastecimento hídrico (Who, 2004; De Moura *et al.*, 2006).

1.2. Estágios evolutivos do *T. gondii*

Os taquizoítos medem de 2 a 4 μm de largura e 4 a 8 μm de comprimento, formam uma estrutura em forma de arco (*toxon* = arco) com um final apical aguçado e uma extremidade posterior arredondada. O porção superior do taquizoíto é caracterizada pela presença de elementos do citoesqueleto, como o conóide e os anéis polares onde são encontradas diversas organelas que compõem o complexo apical (micronemas, roptrias e grânulos densos), que atuam durante o processo de reconhecimento e adesão do parasito aos receptores celulares, invasão e internalização celular e remodelação do vacúolo parasitóforo

para sobrevivencia do parasito, respectivamente. (Figura 3). A película externa do *T. gondii* que se divide em três membranas associada ao citoesqueleto, o qual permite grande motilidade do parasito. Trata-se de uma célula nucleada e com diversas organelas como mitocôndria, complexo de Golgi, ribossomos, retículo endoplasmático liso e rugoso, e o apicoplasto, caracterizado pela presença de quatro membranas (Figura 3).

O taquizoíto compreende na forma de multiplicação rápida do parasita e sua presença caracteriza a fase aguda da doença. Estas formas conseguem invadir todas as células nucleadas do hospedeiro por penetração ativa e, ao invadir, formam um vacúolo citoplasmático também chamado de vacúolo parasitóforo (Dubremetz *et al.*, 1998) (Figura 4).

O mecanismo de invasão celular, formação de vacúolo parasitóforo, são mediadas por uma série de proteínas de secreção do complexo apical do parasito. Após invadir a célula com consequente formação do vacúolo parasitóforo, multiplica-se por meio de um processo especializado chamado endodiogenia ou endopoligenia (Gavin *et al.*, 1962), em que as células filhas se formam internamente dentro da célula mãe (Sheffield, 1968). As intensas replicações sucessivas que ocorrem na célula infectada levam à ruptura da célula hospedeira e os taquizoítos liberados podem penetrar em células adjacentes ou serem transportados para outras áreas do corpo pelo sangue e linfa (Kawazoe, 2011) (Figura 4).

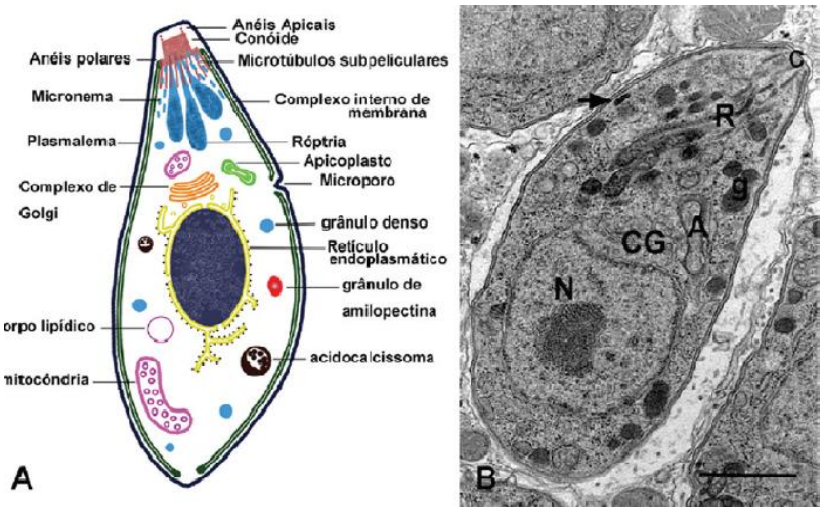

Figura 3. Morfologia geral da forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. **(A)** Representação esquemática. O esquema foi construído a partir de corte aleatórios do parasito observados em

microscopia eletrônica de transmissão. **(B)** Corte longitudinal onde várias das estruturas representadas em **(A)** estão assinaladas: N - núcleo, c - conóide, R - róptrias, A - apicoplasto, CG - Complexo de Golgi, g - grânulo denso, seta - micronema, VP - vacúolo parasitóforo. (de Souza *et al.*, 2010)

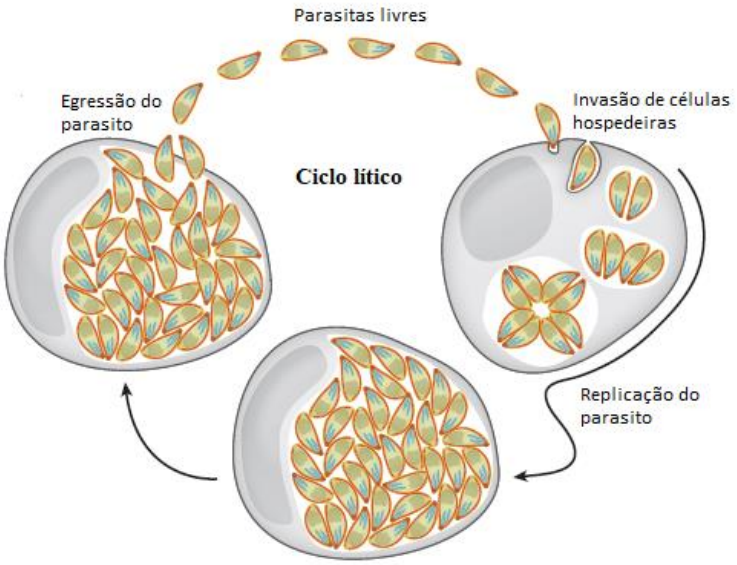

Figura 4: Ciclo lítico da invasão, replicação e egresso do *Toxoplasma gondii* na célula hospedeira. O ciclo lítico ocorre em células nucleadas de seu hospedeiro. O ciclo lisogênico, as intensas replicações dos taquizoítos levam ao rompimento da membrana celular e consequente morte. (Adaptado de Blader, 2015)

Já o estágio bradizoíta resulta da conversão de taquizoítos em um estágio de divisão lento e formam os cistos teciduais (Dubey e Frenkel 1976). Esses cistos são, geralmente, mais esféricos nas células cerebrais ou mais alongadas nas células musculares esqueléticas e cardíacas. Eles variam em tamanho de 10 μm para os cistos mais jovens, contendo apenas dois bradizoitos, até 100 μm para os mais velhos, contendo centenas ou milhares de bradizoítos densamente empacotados (Figura 5A). Os bradizoítos diferem dos taquizoítos em relação à localização do núcleo (central em taquizoítos, terminal bradizoítos), grânulos de amilopectina (numerosos em bradizoítos e ausentes ou poucos em taquizoítos), numerosos grânulos densos em bradizoítos, além de expressarem moléculas funcionalmente diferentes (Ferguson, 2004; Dubey, *et al.*,1998).

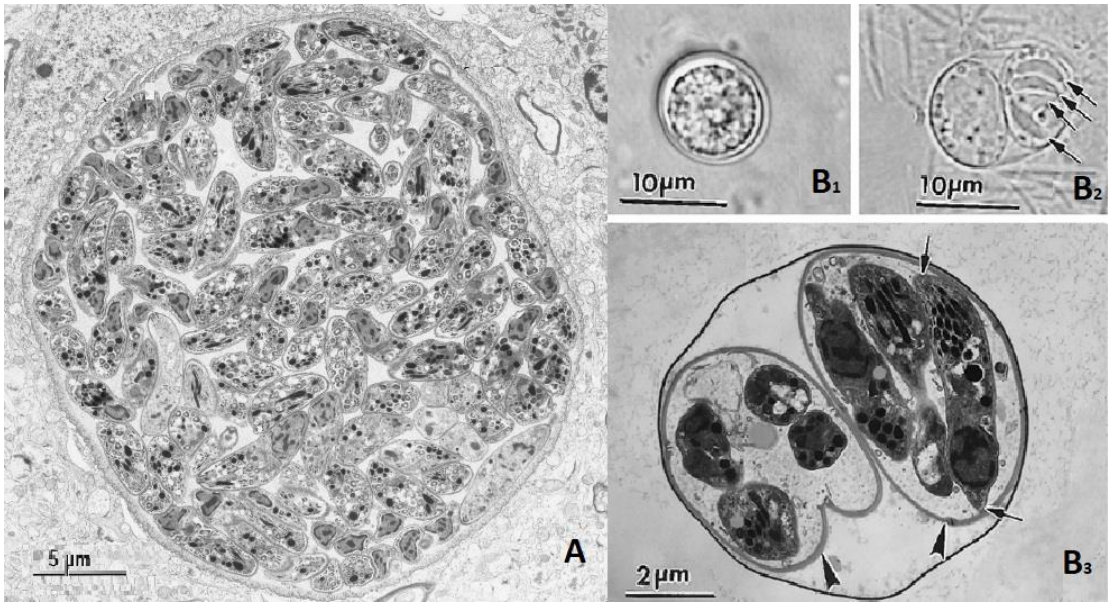

Figura 5: Morfologia das formas de resistência no hospedeiro e no ambiente de *Toxoplasma gondii*. (A) Cisto tecidual contendo bradizoítos, (B1) Oocisto imaturo, (B2) oocisto em processo de espoulação já apresentando dois esporocistos, (B3) oocisto esporulado (Modificado de Dubey *et al.*, 2010).

O cisto tecidual contendo bradizoítos garante viabilidade do parasito e sucesso no estabelecimento da infecção pela ingestão, uma vez que consegue sobreviver à passagem pelo estômago (resiste a pepsina e ácido clorídrico). Além disso, os cistos são refratários à resposta imune do hospedeiro. Os cistos teciduais possuem um metabolismo latente, bem adaptado para a sobrevivência e se formam em uma variedade de células (sistema nervoso central, olhos, cérebro e músculos) permanecendo viável em diversos tecidos do hospedeiro por toda a vida (Dubey 1997; Tenter *et al.*, 2000; Montoya e Liesenfeld, 2004; Gaddi e Yap, 2007). Cistos são estágios infecciosos para hospedeiros intermediários e definitivos. Os cistos contendo bradizoítos são transmitidos aos humanos pelo consumo de carne crua ou malpassada contaminada dos hospedeiros intermediários, principalmente ovinos, caprinos e suínos.

Embora a resposta inflamatória e resposta imune celular contenham a infecção, a ruptura do cisto pode ocorrer, dando origem a cistos-filhos. Após a ruptura do cisto, a conversão para taquizoítos pode resultar na reativação da infecção latente, a exemplo de

camundongos imunocomprometidos (Suzuki *et al.,* 1989; Suzuki e Joh 1994). Da mesma forma, a reativação da infecção latente resulta em encefalite por toxoplasmose, importante causa de doença oportunista na imunodeficiência, como é comumente observado em pacientes portadores de HIV, transplantados e em tratamento quimioterápico (Cohen, 1970; Ruskin e Remington, 1976; Derouin e Pelloux, 2008).

Já o oocisto compreende na forma de resistência do parasito as condições do meio ambiente. Esses são produzidos nas células intestinais dos felídeos e são eliminados imaturos junto as fezes (Figura 5B1). No ambiente, os cistos resistem por semanas ao frio, mas o congelamento a 0ºC ou o aquecimento acima de 67ºC os torna inviáveis a infecção. Os oocistos são esféricos, medindo de 11,0 μm a 12,5 μm possuem uma parede dupla, que confere grande longevidade e após um processo de maturação denominado esporulação (Figura 5B2) que ocorre no meio ambiente esse oocisto apresentara em seu interior dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada (Figura 5B3).

1.3. Patogenia e Virulência

Apesar da alta prevalência sorológica de *T. gondii,* os casos de doença com manifestação clínica são pouco frequentes. Em crianças e adultos imunocompetentes a toxoplasmose é assintomática para a maioria dos pacientes. As manifestações clínicas, quando presentes, atingem somente 10% dos indivíduos, que manifestarão a doença autolimitada, com sintomatologia pouco específica, sem necessidade de tratamento médico. A manifestação clínica mais típica da fase aguda é a linfadenopatia cervical ou occipital (Hill *et al.,* 2005), sendo a miocardite, polimiosite, pneumonite, hepatite ou encefalite menos frequentes, podendo acometer pessoas imunocomprometidas. Nesses casos, a gravidade das manifestações clínicas estará intimamente relacionada ao modo como se deu a infecção, da susceptibilidade imunológica do hospedeiro, da carga parasitária adquirida, e do tipo de cepa do parasito.

Dentro do grupo de risco, os pacientes imunocomprometidos e os recém-nascidos são os mais susceptíveis ao desenvolvimento das formas mais graves da doença. Sendo que nos imunocomprometidos a doença tem um acometimento sistêmico mais acentuado, podendo cursar com encefalite e retinite. Já os recém-nascidos apresentam manifestações clínicas caracterizadas por lesões inflamatórias e necróticas que podem evoluir para um quadro neurológico mais grave, (coriorretinite, encefalite e hidrocefalia) (Montoya e Liesenfeld, 2004), com elevados índices de morbimortalidade.

Em contraste com o curso favorável da toxoplasmose em quase todos os indivíduos imunocompetentes, a doença pode ser fatal naqueles que são imunocomprometidos (Liesenfeld *et al.*, 1999). Nestes indivíduos, o SNC é o local mais afetado pela infecção e quase sempre acontece como resultado de reativação de infecção crônica por acometimento de quadro de imunosupressão (Porter e Sande, 1992). A apresentação clínica da encefalite pelo toxoplasma varia de um processo gradual subagudo evoluindo ao longo de semanas para um estado confusional agudo, com ou sem déficits neurológicos focais, evoluindo ao longo de dias. Manifestações clínicas incluem alterações do estado mental, convulsões, déficits motores focais, distúrbios dos nervos cranianos, anormalidades sensoriais e distúrbios do movimento (Sabin, 1942). Além disso, estudos mais recentes tem demonstrado que o *T. gondii* é capaz de causar mudanças comportamentais em humanos, a condição sendo também correlacionada com esquizofrenia (Yolken *et al.*, 2001; Torrey *et al.*, 2007) e transtorno bipolar (Pearce *et al.*, 2012; Hamdani *et al.*, 2013).

Outra forma grave da toxoplasmose é a doença congênita. Para que ocorra a transmissão transplacentária é necessário que a gestante esteja em fase aguda devido a primo-infecção ou tenha havido uma recrudescência da infecção crônica associada a um quadro de imunodepressão. A gravidade das manifestações clínicas para o feto dependerá principalmente da idade gestacional, do grau de exposição ao parasito, da virulência da cepa

assim como da imunidade do hospedeiro e de fatores genéticos do partasito (Bossi *et al.*, 2002; Maubon *et al.*, 2008; Morisset *et al.*, 2008). Os fetos com toxoplasmose congênita geralmente aparentam normalidade na ultrassonografia pré-natal. Os achados sugestivos da doença congênita, quando presentes, incluem calcificações intracranianas, dilatação ventricular, aumento hepático, ascite e aumento da espessura da placenta (Gay-Andrieu *et al.*, 2003). As manifestações clínicas neonatais da toxoplasmose congênita variam amplamente e incluem hidrocefalia, microcefalia, calcificações intracranianas, coriorretinite, estrabismo, cegueira, epilepsia, psicomotricidade ou retardo mental, petéquias por trombocitopenia e anemia (McAuley *et al.*, 1994; Swisher *et al.*, 1994). A toxoplasmose congênita (TC) é, portanto, a forma mais grave da toxoplasmose por possuir altos índices de morbidade e mortalidade.

O curso da infecção induz a uma resposta imune inata e adaptativa mediada por células que tende a controlar a replicação do parasito no hospedeiro, eliminando os taquizoítos do sangue, linfa e dos órgãos viscerais, ocorrendo uma diminuição do parasitismo (Filisetti e Candolfi, 2004). Todavia essa resposta imune é incapaz de eliminar a infecção. Com a liberação dos taquizoítos ao meio, que acabam por disseminar pela corrente sanguínea ou linfa, acabam por infectar qualquer tecido do corpo, apresentando tropismo pelo tecido muscular esquelético e pelo SNC (Remington e Cavanaugh, 1965; Montoya e Liesenfeld, 2004). A liberação dos taquizoítos provoca uma forte resposta inflamatória pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos “Pamps”, por exemplo glicosilfosfatidilinusitol via Toll Like Receptor, bem como pela destruição tecidual e, portanto, responsáveis pelas manifestações clínicas da doença.

Paralelamente em resposta ao estresse ambiental, os taquizoítos convertem em um estágio evolutivo conhecido como bradizoítos, para a formação de cistos teciduais onde permanecem contidos isolados da imunidade do hospedeiro (Dubey e Frenkel 1976). O

aparecimento da imunidade do hospedeiro paralelamente à formação de cistos teciduais nos seus tecidos caracteriza a cronificação da doença (Gaddi e Yap, 2007).

Um dos aspectos mais intrigantes desse protozoário é sua variabilidade quanto ao potencial patogênico e à diferença de virulência. A infecção é resultante da ruptura do equilíbrio parasito-hospedeiro, em favor do parasito. De forma geral, a virulência de cepas de *T.gondii* é determinada de acordo com observado em ensaios com modelos murinos. Nas infecções experimentais, a severidade da toxoplasmose depende dos fatores relacionados ao hospedeiro, a cepa do parasito, do modelo biológico bem como a rota de inoculação.

O levantamento de isolados do parasito de humanos e animais da Europa e América do Norte mostrou que *T. gondii* possui uma estrutura populacional clonal genética com três linhagens principais que podem ser classificados em: virulenta, virulência intermediária e avirulenta (Howe e Sibley 1995). A linhagem clonal classificada como do Tipo I é um modelo de parasito virulento, na qual se observa altas taxas de mortalidade em camundongos na fase aguda da infecção, enquanto que as linhagens dos tipos II e III possuem virulência intermediária ou são avirulentos, respectivamente (Sibley e Boothroyd, 1992; Su *et al.*, 2002).

Alguns genes codificadores de proteínas estão presentes nas organelas do complexo apical do *T. gondii*, como GRA15, ROP5, ROP16, ROP17, ROP18, denominadas de proteínas de virulência, estão envolvidos na modulação do sistema imunológico do hospedeiro e são pontos chave na determinação da virulência de *T. gondii* para camundongos (Carruthers e Boothroyd, 2007; Melo *et al.*, 2011; Lamarque *et al.*, 2014; Blader *et al.*, 2015; Hakimi e Bougdour, 2015).

Estudos mais recentes mostraram que diferentemente das cepas encontradas na América do Norte e Europa, existe uma alta diversidade genética entre as cepas não clonais de *T. gondii* isolados na América Central e Sul, que são denominadas de cepas atípicas

(Ajzenberg *et al.,* 2004; Lehmann *et al.,* 2006; Khan *et al.,* 2007; Pena *et al.,* 2008; Dubey *et al.,* 2008; Ferreira *et al.,* 2006, 2011; Su *et al.,* 2012 Carneiro *et al.,* 2013). Com o desenvolvimento de técnicas recentes de genotipagem foi possível identificar uma maior complexidade na América Central e do Sul, como também na América do Norte (Rajendran *et al.,* 2012; Su *et al.,* 2012).

Nas regiões do sul do Brasil, altos níveis de doença ocular recorrente e grave têm sido descritos em adultos saudáveis, muitos dos quais adquiriram a infecção no período pós-natal (Silveira *et al.,* 2001). Esse fato já foi demonstrado também nos EUA por Grigg e col., (2001) que observaram que algumas linhagens incomuns das cepas do tipo I, foram achadas em indivíduos imunocompetentes e que sofrem com toxoplasmose ocular grave. A filogenia de isolados de *T. gondii* encontradas na região Sul do Brasil, bem como em outras localidades como em Minas Gerais são geneticamente distintas das linhagens clonais, sugerindo que existam altas taxas de recombinação gênica das cepas de *T. gondii* (Pena *et al.,* 2008). Dessa maneira, o *T. gondii* é a causa mais frequente de infecções na parte posterior do olho. Diversos outros casos de toxoplasmose ocular grave têm sido relatados em pacientes imunocompetentes, sendo alguns deles atribuídos à infecção por genótipos atípicos de *T. gondii* (Ajzenberg *et al.,* 2004; Demar *et al.,* 2007; Elbez-Rubinstein *et al.,* 2009; Grigg e Sundar 2009; Delhaes *et al.,* 2010; Pomares *et al.,* 2011). Vallochi e col., (2005) realizaram um levantamento de indivíduos com manifestações de toxoplasmose ocular em São Paulo (SP) e Erechim (RS), e observou que se tratava predominantemente de cepas atípicas.

Carneiro e col., (2013) realizaram uma caracterização da diversidade de genótipos de *T. gondii* isolados de recém-nascidos em Minas Gerais, Brasil. Foram obtidos 27 isolados de *T. gondii*, dos quais 92% (24 isolados) possuíam virulência significativa. Dentre as 24 cepas atípicas consideradas virulentas, 20 delas originaram de recém-nascidos com retinocoroidite.

1.4. Diagnóstico

O diagnóstico realizado para toxoplasmose pode ser clínico ou laboratorial. O diagnóstico clínico é difícil, uma vez que indivíduos em fase aguda, isso quando houver sintomas, podem apresentar apenas febre e linfadenopatia, evoluindo para a fase crônica. Devido as dificuldades encontradas no exame clínico, é necessário confirmação por diagnóstico laboratorial. O diagnóstico de toxoplasmose é realizado rotineiramente com base em testes sorológicos (Sabin e Feldman, 1948; Montoya e Remington, 1995; Wilson, Remington *et al.*, 1997). A determinação da fase da infecção é realizada pela pesquisa da reatividade de anticorpos (imunoglobulinas) anti-*Toxoplasma* (IgG e IgM), que podem ser realizados pelo teste de Sabin-Feldman (*Dye test*), RIFI, HAI, ELISA e reação de ensaio imunoenzimático de micropartículas. Além disso, o diagnóstico pode ser realizado pela demonstração histológica do parasito (Dorfman e Remington, 1973; Cerezo *et al.*, 1985), pelo isolamento e por técnicas moleculares *Polymerase Chain Reaction* (PCR) geralmente empregadas em casos de TC (Remington, *et al.*, 2004).

1.5 Tratamento

A maioria dos casos de toxoplasmose não necessita de tratamento em indivíduos imunocompetentes, uma vez que o curso da infecção é, geralmente, autolimitado. A recomendação médica para tratamento inclui os indivíduos que compõem o grupo de risco: indivíduos imunocompententes com manifestação clínica na fase aguda, gestantes e indivíduos com o sistema imunológico debilitado (Prado, 2011). O padrão ouro atual para o tratamento da toxoplasmose, é a combinação de pirimetamina e sulfadiazina (PYR-SDZ) (Brasil, 2010). Sabin e Warren (1942) relataram a eficácia de sulfonamidas contra a toxoplasmose em modelos murinos. Eyles e Coleman (1953) descobriram que as

sulfonamidas quando combinadas com derivados de diaminopirimidina, como trimetropim e pirimetamina, possuíam efeito sinérgico contra o *T. gondii*. As sulfonamidas e as diaminopirimidinas são conjuntamente denominadas drogas anti-folatos, uma vez que bloqueiam sequencialmente a diidropteroato sintetase, que transformam o ácido para-aminobenzóico em ácido fólico, e a diidrofolato redutase, que reduz o ácido fólico a ácido folínico (tetraidrofolato), respectivamente nos organismos.

O ácido fólico é uma vitamina encontrada principalmente em alimentos e possui numerosas funções no organismo. Entre elas: a síntese e reparação do DNA, divisão e crescimento celular, produção de proteínas e formação de hemácias. O mecanismo de bloqueio no metabolismo do ácido fólico pelo uso de sulfonamidas e diaminopirimidinas impedem a formação de ácido folínico e consequentemente de ácidos nucleicos. O bloqueio na cadeia de formação do ácido folínico altera a produção de proteínas pelo protozoário, enquanto que no indivíduo infectado a carência de ácido folínico causa toxicidade medular. Em altas doses, a pirimetamina pode causar supressão medular, podendo se manifestar como anemia megaloblástica, alterações hematológicas, leucopenia, trombocitopenia, pancitopenia, reações de hipersensibilidade e também aumentam o risco de cálculos renais (Nasr *et al.*, 2016; Montazeri *et al.*, 2017). Já a administração das sulfadiazinas os efeitos colaterais mais comumente observados tem-se a cristalúria, que resulta em nefrotoxicidade; as reações de hipersensibilidade como urticária, angioedema e síndrome de Stevens-Johnson; os –distúrbios hematopoiéticos**,** sendo que a anemia hemolítica é encontrada em pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, podendo ocorrer também a granulocitopenia e trombocitopenia. Já os recém-nascidos podem desenvolver icterícia nuclear (kernicterus) uma vez que a SDZ desloca a bilirrubina dos locais de ligação na albumina sérica. A bilirrubina fica livre para entrar no sistema nervoso central, pois a barreira hematencefálica do recém-nascido ainda não está completamente desenvolvida. Dessa maneira, a administração de ácido

folínico na forma de folinato de cálcio como coadjuvante é indicado para corrigir o risco de supressão da medula óssea causada pelo uso de pirimetamina e sulfadiazina, durante o tratamento de toxoplasmose (Montoya e Liesenfeld, 2004). Essa combinação de PYR-SDZ e ácido folínico também são indicadas no tratamento de toxoplasmose ocular. Corticosteróides sistêmicos são associados dependendo da evolução clínica do comprometimento ocular (Holland e Lewis, 2002).

Em 1958, Garin e Eyles observaram atividade anti-*T. gondii* da espiramicina em camundongos, um antibacteriano pertencente ao grupo dos macrolídeos. Atualmente outros macrolídeos além da espiramicina tem sido utilizado para tratamento de toxoplasmose, dentre eles a azitromicina e claritromicina. Trata-se de substâncias que, diferentemente de PYR-SDZ, atuam inibindo a síntese das proteínas do parasito (Oliveira, 2007) e não atravessam eficazmente a placenta. Espiramicina tem sido utilizada profilaticamente em mulheres em fase aguda da infecção por toxoplasmose durante o primeiro trimestre da gravidez, reduzindo a probabilidade da transmissão vertical em até 60% (Wallon *et al.*, 1999; Remington *et al.*, 2001) e grave doença neurológica e ocular, bem como anormalidades cardíacas e cerebrais no feto (Desmonts e Couvreur, 1974; Montoya e Remington, 2008; Paquet e Yudin, 2013). Todavia, nas gestantes com infecção fetal estabelecida, PYR-SDZ demonstra ser mais eficaz na prevenção da transmissão vertical e na minimização da gravidade da toxoplasmose congênita, no entanto PYR-SDZ não é indicado para gestantes no primeiro trimestre de gestação, uma vez que PYR é teratogênica.

Na década de 1970 pesquisadores observaram que a clindamicina quando associada a pirimetamina é eficaz em infecção com acometimento de toxoplasmose ocular. No entanto, esta terapia é menos eficaz na prevenção de recaídas e apresenta taxas de toxicidade semelhantes à SDZ (Montoya e Liesenfeld, 2004; Alday e Doggett, 2017).

Em indivíduos com HIV, a profilaxia da encefalite por toxoplasmose é realizada mediante tratamento de monoterapia com PYR, da associação sulfametoxazol - trimetropim ou PYR-clindamicina em indivíduos que possuem intolerância a SDZ (Kaplan *et al.*, 2009). A clindamicina se apresenta eficaz em indivíduos imunocomprometidos, como demonstrado por Dedicoat e Livesley (2010) que realizaram uma meta-análise comparando a eficácia de PYR-SDZ e PYR-clindamicina no tratamento de encefalite toxoplásmica em indivíduos portadores de HIV, não encontrando diferenças estatísticas significativas entre elas. Além disso, já foi demonstrado que a intolerância a sulfonamidas em pacientes HIV positivos chega a ser 10 vezes mais frequente do que na população em geral (Mathelier-Fusade e Leynadier 1993). Dessa maneira, a medicação recomendada aos indivíduos intolerantes à sulfadiazina e com quadro de toxoplasmose ocular e encefálica é a PYR-clindamicina.

Na década de 1990 foi desenvolvida a atovaquona, uma droga pertencente à classe das hidroxinaftoquinonas, que diferentemente das terapias citadas anteriormente, atua sobre a mitocôndria do parasito inibindo a produção de moléculas pelo complexo citocromo bc1 envolvidas na cadeia respiratória. O complexo citocromo bc1 é uma enzima respiratória essencial presente no complexo interno da membrana mitocondrial de organismos eucarióticos (Kessl *et al.*, 2003). Essa terapia pode ser aplicada associada a PYR ou SDZ e profilaticamente no tratamento da toxoplasmose quando o padrão ouro é contraindicado (Belá, 2007).

Apesar do progresso significativo no tratamento de doenças humanas, a toxoplasmose continua sendo uma ameaça à saúde para diversas populações de pacientes, incluindo pacientes imunocomprometidos, gestantes e pacientes com doença ocular. Os tratamentos disponíveis são insuficientemente eficazes, exigem cursos prolongados que variam de semanas a mais de um ano, ou demonstram toxicidade significativa. Além disso, nenhuma das terapias disponíveis para tratamento da toxoplasmose possuem efeito sobre as formas latentes

da infecção (cistos). Nesse contexto, torna-se indispensável o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento da toxoplasmose. O futuro desenvolvimento de medicamentos deve se concentrar em novas moléculas-alvo que levam a drogas altamente potentes sem toxicidade ou em formulações aprimoradas. Essas abordagens também devem considerar a eficácia de drogas contra o estágio latente da infecção por *T. gondii*, já que curar pacientes da infecção é a estratégia mais desejável para prevenir a reativação, principalmente no que diz respeito a indivíduos imunocomprometidos.

1.6 Os peptídeos antimicrobianos (AMPs)

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs: do inglês *antimicrobial peptides*) compreendem um grupo diverso de moléculas de baixa massa molecular constituintes de células de organismos eucariotos e procariotos. Os AMPs são expressos pelos organismos de forma constitutiva ou induzida por uma grande variedade de células, compõem a imunidade inata atuando como primeira linha de defesa química contra um amplo espectro de microorganismos capazes de causar doenças (Izadphanah e Gallo, 2005; Giuliani, 2007), e por isso, tem se mostrado como potenciais candidatos ao desenvolvimento de terapias antimicrobianas. A literatura registra AMPs de diversas fontes como de artrópodes, mamíferos, anfíbios, organismos marinhos, plantas, bactérias e fungos. Os AMPs são moléculas que possuem ampla variedade quanto a sequência, estrutura e conformação. Em geral, são formadas por cadeias de resíduos com 12 a 50 aminoácidos unidos por ligações peptídicas e são positivamente carregadas. Apresentam também uma estrutura secundária anfipática, parcialmente hidrofóbica e catiônica (Marr, 2006). Essas estruturas secundárias dos peptídeos podem adotar conformação de folhas-β, conformações anfipáticas em α-hélice, lineares estendidos e circulares (Figura 6) (Vale *et al.*, 2014; Lewies *et al.*, 2015).

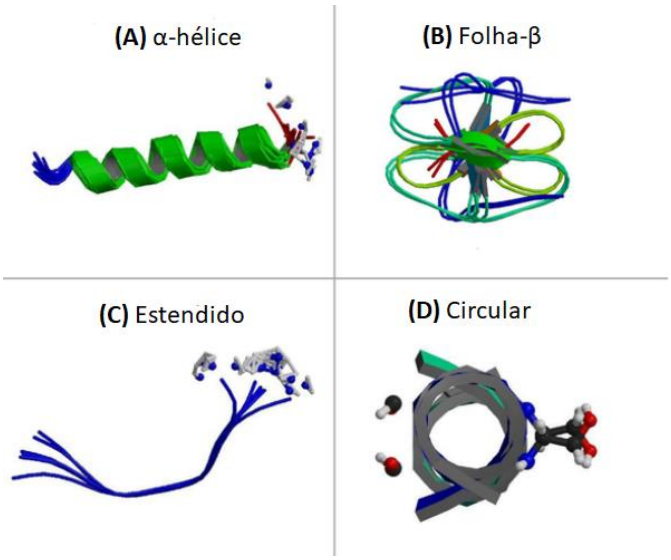

Figura 6: Quatro classes de AMPs. (A) peptídeos α-helicoidais, (B) peptídeos compostos por uma série de folhas β, (C) peptídeos que adotam estruturas não convencionais, como hélices estendidas, e (D) peptideos circulares (adaptado de Peters, Shirtliff e Jabra-Rizk, 2010).

O primeiro AMP que se tem relato foi isolado da hemolinfa de mariposa *Hyalophora cecropia* em 1980 e possuía atividade contra bactérias (Steiner *et al.*, 1981), e pouco tempo depois diversos outros AMP's foram sendo identificados (Okada e Natori, 1983). A classe insecta compreende no maior grupo de animais que se tem notícia. Alguns peptídeos de insetos sintetizados a partir de diversos tecidos e células como da gordura, hemolinfa e células epiteliais, demonstram atividade contra bactérias e fungos (Cerovsky e Bém, 2014). Já foi mostrado eficácia de AMP's de insetos contra *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus megatherium*, e *Micrococcus luteus* (Andreu *et al.*, 1985). Existem ainda peptídeos isolados de veneno de alguns artrópodes como aranhas e escorpiões abundantes em toxinas (Guo *et al.*, 2013). Peptídeos sintetizados do veneno de artrópodes já foram descritos com atividade antimicrobiana, hemolítica para células cancerígenas, contra protozoários, analgésica, antiarrítmico, imunomoduladoras, neurotóxicas, antivirais, contra sarampo e HIV (Corzo *et al.*, 2001; Saez *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012). Estudos utilizando de peptídeos oriundos de plantas tem demonstrado atividade contra patógenos em humanos, em especial

bactérias e fungos (Harris *et al.*, 2014). Estudos envolvendo peptídeos marinhos se mostram como potenciais candidatos ao desenvolvimento de fármacos com atividade antibiótica e antitumoral (Guimarães *et al.*, 2010). Pesquisas realizadas por Xu e Lai (2015) relatam a um grande grupo de AMP's oriundos da pele de anfíbios com atividade de em largo espectro contra protozoários, microrganismos e células tumorais.

Até o momento, mais de 3200 AMP's com propriedades contra bactérias, fungos, vírus, protozoários e antitumoral, foram descobertos ou sintetizados (Disponível em http://aps.unmc.edu/AP/main.php; *Antimicrobial Peptide Database*) e têm sido agrupados com base no número de aminoácidos e sua forma estrutural. A literatura registra vários mecanismos sobre a interação dos diferentes tipos de AMP's já foram propostos para explicar a atividade e especificidade sobre microrganismos (Chan, *et al.*, 2006). Além disso, pesquisas mais recentes vêm demonstrando eficácia de AMP's contra *T. gondii.* Tang e col, (2019) avaliaram o efeito de lycosin-I, um peptídeo oriundo de veneno de aranha *Lycosa singoriensis* na invasão e proliferação de taquizoítos de *T. gondii*, onde os resultados encontrados apontaram a lycosin-I como potencial alternativa para o tratamento da toxoplasmose. Outro projeto realizado por Hou e col, (2019), na china, mostrou efeito de peptídeos do veneno de duas serpentes *(Ornitoctonus huwena* e *Chilobrachys jingzhao*) e também constataram que ambos possuem efeito na invasão e proliferação do *T. gondii in vitro*.

As diferentes estruturas adotadas pelos AMP's estão relacionadas ao mecanismo de ação sobre microrganismos e são agrupadas de acordo com a atividade antimicrobiana que exercem (Brogden, 2005). A classe de AMP mais estudada é a α-hélice sendo a maioria deles catiônicas. A carga positiva no AMP é o principal fator para a interação inicial com as membranas bacterianas com carga negativa (Figura 7A) (Bahar & Ren, 2013).–Além disso, AMP's são capazes de induzir resposta imune adaptativa em diversos organismos (Figura 7B) (Mansour e Hancock, 2015; Zhang e Gallo, 2016).

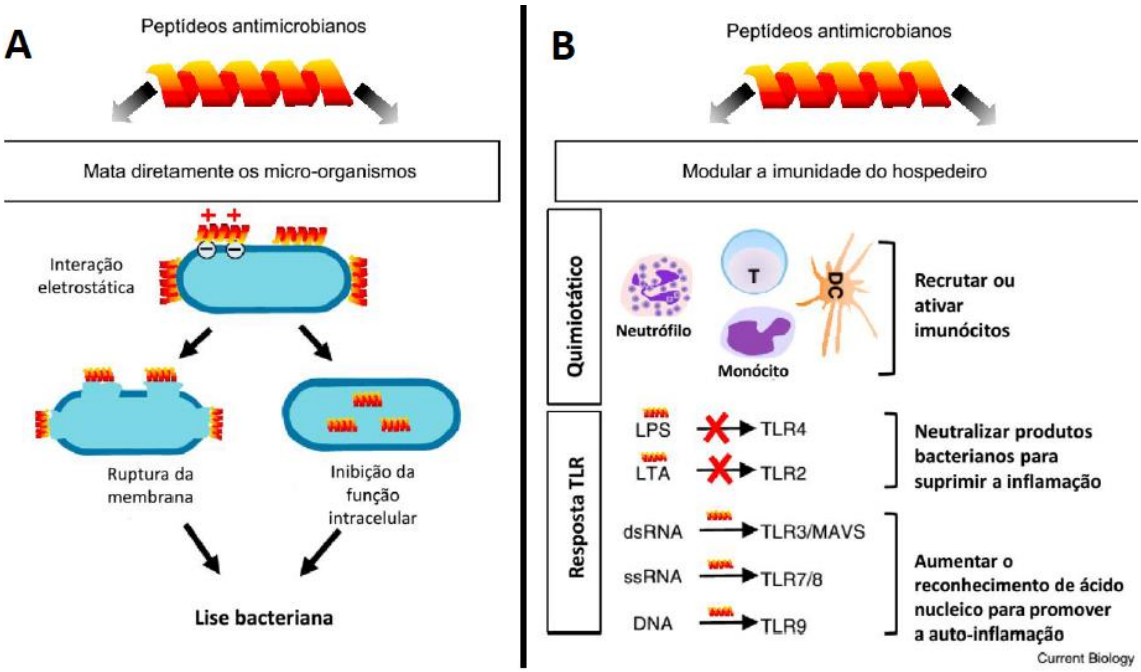

Figura 7. (A) Ação biológica dos peptídeos antimicrobianos. Os AMP's ligam-se na superfície das membranas por meio de interações eletrostáticas, tanto para lisar a membrana ou para entrar no microrganismo para inibir alguma função intracelular. (B) Alguns AMP's modulam a imunidade do hospedeiro recrutando / ativando imunócitos ou influenciando o reconhecimento do receptor Toll-like (TLR) de produtos microbianos e ácidos nucleicos liberados com dano tecidual. DC, de células dendríticas; LPS, lipopolissacarídeo; LTA, ácido lipoteicóico; MAVS, proteína mitocondrial de sinalização antiviral. (Modificado de Zhang e Gallo 2016).

A maneira a qual os peptídeos interagem com células bacterianas ainda não são totalmente esclarecidas, mas desde o início dos estudos relacionados a estes mecanismos, diversos modelos tem sido propostos pelos pesquisadores (Chan, *et al.*, 2006). Um modelo é o do poro estável (Figura 8A), que envolve a associação dos peptídeos com as cadeias carbônicas das membranas dos lipídeos formando um canal transmembranar em formato de barril onde a face hidrofílica do peptídeo fica voltada para o interior do corpo (Brogden, 2005). Um segundo modelo é o do carpete (Figura 8C) (Pouny *et al.*, 1992), neste os peptídeos ligam-se a membrana-alvo de maneira semelhante ao modelo do poro estável no qual ocorre uma forte atração eletrostática entre os resíduos catiônicos dos peptídeos com as cargas negativas dos fosfolipídios, formando algo semelhante a um tapete, em seguida, os peptídeos podem causar a permeabilização, dano estrutural e perda da membrana, podendo

levar a formação de micelas (Shai e Oren, 2001). Esse mecanismo é citado por vários autores como modelo detergente. O terceiro modelo é o tipo poro toroidal (Figura 8B), os peptídeos anfipáticos interagem eletrostaticamente com a os fosfolipídios se inserindo na membrana, separando as cabeças polares dos fosfolipídeos dobrando-se para a formação de um poro ficando expostas as partes hidrofílicas dos fosfolipídios e dos peptídeos (Brogden, 2005). Esses três mecanismos são descritos por diversos autores e são considerados como os principais mecanismos de ação dos AMP's. No modelo de eletroporação molecular (Figura 8D) os peptídeos catiônicos se associam à membrana bacteriana e geram uma diferença de potencial elétrico através da membrana formando poros por eletroporação (Tieleman, 2004). Por fim, o modelo de jangada de afundamento (Figura 8E) que propõe que a ligação dos peptídeos anfipáticos causa um desequilíbrio de aumentando assim a curvatura da membrana local. À medida que os peptídeos se associam, afundam na membrana, criando poros transitórios.

Portanto, os AMP's podem atuar de forma direta ao interagirem com os fosfolipídeos das membranas de microrganismos causando perturbações na estrutura da bicamada lipídica, ocasionando a ruptura celular, permeabilização ou formação de poros. Além disso alguns AMP's também podem matar os microorganismos sem danificar a célula (Lewies *et al.*, 2015) ao alterar importantes processos moleculares e metabólicos, como inibição da síntese de DNA/RNA e de proteínas, atividades a partir de espécies ativas de oxigênio (ROS) (Zasloff, 2002; Giuliani *et al.*, 2007; Auvynet e Rosenstein, 2009; Roscia *et al.*, 2013).

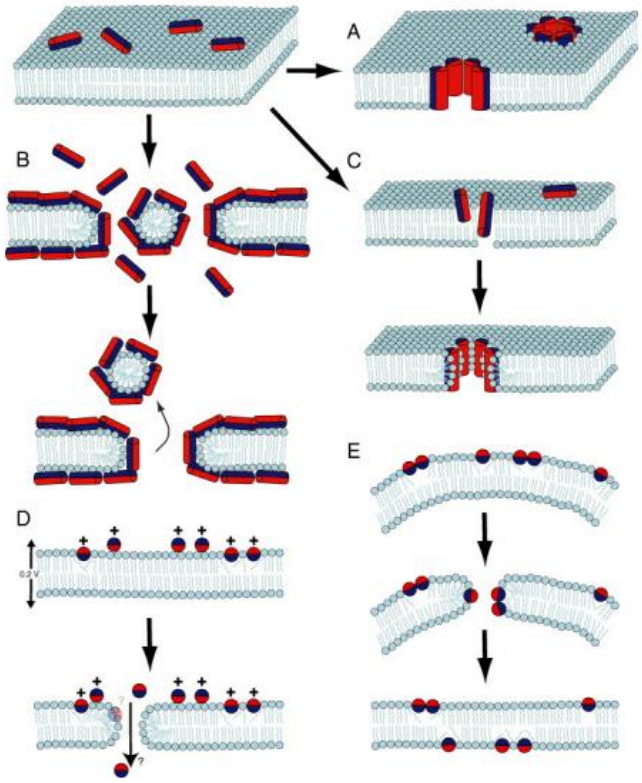

Figura 8. Modelos de mecanismos de ação propostos para a permeabilização de membranas celulares por AMP's. A, B, e C começam da mesma conformação, onde os peptídeos se associam na membrana. A região vermelha e azul dos peptídeos representa a face hidrofílica e hidrofóbica, respectivamente. (A) Modelo poro estável, (B) Modelo carpet, (C) Modelo eletroporação molecular, (D) Modelo de jangada afundando (Chan, *et al.*, 2006).

Devido os AMP's apresentarem variados mecanismos de ação, inclusive diferente dos antibióticos, como criação de uma maior dificuldade para o desenvolvimento de resistência microbiana, por possuir sinergismo aos antibióticos convencionais, ação microbicida rápida, por possuírem toxicidade seletiva as células patogênicas, pela capacidade de neutralizar endotoxinas e por poderem ainda atuar como moléculas de sinalização (Marr *et al.*, 2006; Giuliani *et al.*, 2007; Roscia *et al.*, 2013; Aoki & Ueda, 2013; Pushpanathan *et al.*, 2013), os AMP's se apresentam como um dos futuros mais promissores no desenvolvimento de estratégias para combater infecções e resistência microbiana a medicamentos. Isso é evidente pelo crescente número de estudos para os quais esses os peptídeos são submetidos que os tornam favoráveis a área farmacêutica.

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é uma doença infecciosa de distribuição global que afeta mais de um terço da população em todos os continentes, sendo sua prevalência e patogenicidade variável de acordo com a localização geográfica, cepa do parasito e imunidade protetora do hospedeiro. A toxoplasmose apresenta quadro grave de evolução em indivíduos com o sistema imune comprometido (receptores de órgãos, indivíduos em tratamento quimioterápico e portadores de HIV). As terapias disponíveis para o tratamento da toxoplasmose são insuficientemente eficazes tanto o estágio agudo quanto o latente da infecção, exigem cursos prolongados de uso e/ou demonstram toxicidade significativa. Nesse contexto, é necessário desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento dessa enfermidade.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito *in vitro* de uma biblioteca de peptídeos sintéticos de forma a identificar uma nova molécula com atividade anti-*T. gondii*.

3.2. Objetivos específicos

a) Verificar o efeito citotóxico dos peptídeos em linhagem de fibroblastos humanos NDHF.

b) Avaliar o efeito dos peptídeos na proliferação intracelular de *T. gondii* em fibroblastos NDHF infectados com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*.

c) Verificar o potencial de invasão celular dos taquizoítos após o tratamento dos parasitos extracelulares.

d) Verificar o potencial de invasão celular dos taquizoítos em células pré-tratadas com concentrações não citotóxicas de AMP's.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Peptídeos utilizados

A biblioteca de peptídeos testada foi cedida pela Professora Dra. Mariana Quezado (Laboratório de Veneno e Toxicologia Animal do Departamento de Bioquímica e Imunologia - UFMG). Dentre os peptídeos sintéticos testados incluem: (a) fenilseptinas, identificadas na secreção da pele da rã *Hypsiboas punctatus* (L-Phes e D-Phes); (b) litotoxinas (LyeTx1), do veneno de *Lycosa erythrognatha;* (c) surfactina, produzidas por bacterias do gênero *Bacillus sp*.

4.2 Cultivo e manutenção de células NDHF

Culturas primárias de NDHF ("Normal Dermal Human Fibroblast", Lonza) foram mantidas em frascos de cultivo de 25 cm^2 e 75 cm^2 (Kasvi) contendo meio RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB; Gibco), 100μg/ml Penicilina e 100μg/ml Streptomicina, Fungizona (anti-anti Gibco) e 2mM de glutamina. As culturas foram mantidas em estufa a 37 ºC com atmosfera úmida e 5% de CO_2.

4.3 Manutenção da cepa RH de *Toxoplasma gondii*

Taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH, genótipo tipo 1, isolada por Sabin em 1939 de uma criança nos Estados Unidos (Sabin, 1941), foram cultivados através de passagens em culturas de NDHF (Normal Dermal Human Fibroblasts, Lonza) em frascos de 25 cm^2 em meio RPMI completo, conforme descrito acima, e mantidos em estufa a 37 ºC com atmosfera úmida e 5% de CO_2. Após a completa lise das culturas infectadas pelos taquizoítos, cerca de 20-50 µL do meio contendo os parasitos eram transferidos para um novo frasco de cultivo de 25 cm^2 contendo células NDHF em monocamada confluente e meio RPMI fresco.

4.4 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTS/PMS (Promega, Madison, WI, USA), que consiste no uso de um composto tetrazólico (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, MTS) e um reagente acoplador de elétron (PMS). A viabilidade por este método é avaliada através da bio-redução do composto tetrazólico em um sal de formazan de cor solúvel no meio de cultivo pelas enzimas desidrogenases nas células viáveis. Para a avaliação da citotoxicidade monocamadas de células NDHF contidas em frascos de 25 cm^2 foram removidas por meio de tripsinização (0,05% Tripsina verseno, Gibco), ressuspendidas em meio de cultivo e com o auxílio de uma pipeta multicanal foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços transparentes com fundo chato. Após a obtenção da monocamada as células foram tratadas nas concentrações de 16,5; 31; 62,5; 125; 250 µg/ml com D-Phes e L-Phes e nas concentrações de 3; 6; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 1,79; 3,58; 7,17; 14,35; 28,7; 57,4 µg/ml de LyeTx1 e surfactina, respectivamente por 96h. Ao término do tratamento, o meio de cultivo com os peptídeos foi removido e as células lavadas com PBS (tampão fosfato-salino, do inglês: phosphate buffered saline) pH 7,4. Após a lavagem cada poço foi preenchido com 100 µL de 10mM de glicose em PBS e 20 µL do reagente MTS/PMS conforme recomendado pelo fornecedor (Promega, Madison, WI, USA). Como controle negativo foram utilizadas células fixadas com 4% formaldeído, já o controle positivo as células foram suplementadas apenas com meio RPMI. Após 2h de incubação em estufa a 37 ºC a absorbância foi avaliada a 490 nm em leitor de microplaca Biotek. A citotoxicidade foi calculada como a porcentagem de células viáveis após o tratamendo com as diferentes concentrações dos peptídeos versus as células não tratadas (controle positivo).

4.5 Ensaio de proliferação celular

Placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro foram semeadas com células NDHF. Após a obtenção da monocamada, as células NDHF foram contados em objetiva de 40x em microscópio óptico invertido (Olympus IX 70) para determinar o número de células por poço. Para a infecção das células taquizoítos recém egressados foram centrifugados em tubo cônico de 15 ml Falcon em centrifugador Fanem® mod. 206 a 1750 rpm por 5 minutos. Após centrifugados o sobrenadante foi descartado e em seguida o pellet de parasitos ressuspendidos em 1 ml de meio RPMI. 10 µL de taquizoítos foram então diluídos em 490 µL de solução de contagem contendo 4% formaldeído em tubo eppendorf. A solução contendo os parasitos foi homogeneizada em vortex e com o auxílio de uma pipeta 10 µl foi inserido em câmara de Neubauer e a proporção de parasitos/ml foi estimada em microscópio óptico de contraste de fase (Leica DM 500). Em seguida taquizoítos foram então ressuspendidos em meio RPMI e colocados para interagir com as células contidas na placa em uma proporção de 10:1 (taquizoítos/célula), recebendo cada poço 250 µL de meio RPMI completo contendo os parasitos. A placa foi mantida a 37 ºC com atmosfera úmida e 5% de CO_2 por 4 horas. Após período de invasão, o meio foi retirado dos poços, e lavado com meio RPMI para remoção dos taquizoítos extracelulares. Em seguida foi adicionado aos poços concentrações dos peptídeos de 50 e 100 µg/ml de L-Phes e D-Phes, 3 µg/ml de LyeTx1 e 14,35 e 28,7µg/ml de surfactina em 250µl de meio RPMI completo (determinadas no ensaio de citotoxicidade). A placa contendo as células infectadas em tratamento foi incubada a 37 ºC com atmosfera úmida e 5% de CO_2 por 24 horas. Ao término do período de tratamento a cultura foi lavada com PBS pH 7,4, as células e os taquizoítos foram fixados com Bouin e coradas com kit Panótico Rápido (Laboricin, Brasil). As lamínulas foram então montadas em lâminas com Entelan® e a proliferação foi avaliada pela contagem de células infectadas e o número total de taquizoítos por célula em microscópio óptico de campo claro Olympus BX

40. Foi determinado o índice de infectividade de acordo com a formula abaixo descrita (Araujo-Jorge e Souza, 1984).

$$Indice\ de\ infectividade = \frac{\text{\% de células infectadas x Número total de parasitos}}{\text{Número total de células}}$$

A atividade anti-*Toxoplasma* foi determinada indice de infectividade para as diferentes concentrações testadas, verificando se houve inibição da proliferação intracelular dos taquizoítos em células NDHF. Foi aplicado aos resultados o teste estatístico One Way ANOVA para comparação individual das diferentes concentrações dos peptídeos versus o controle positivo. Em cada experimento foram avaliadas 2 lamínulas por cada condição de tratamento realizados em triplicata.

4.6 Ensaio de invasão celular parasito-célula

Taquizoítos da cepa RH recém egressados e células NDHF em placa de cultura de 24 poços foram contados como descrito no item 4.5. Após a contagem os taquizoítos ressuspendidos em meio RPMI foram aliquotados em microtubos de 1,5 ml na proporção de 10:1 parasitos/célula contendo os peptídios nas concentrações utilizadas no ensaio anterior em um volume de 250 µl. Em seguida, o meio contendo os parasitos e os peptídios foram colocados para interagir com as células NDHF contidas em lamínulas redondas em placa de 24 poços por 4h. Ao término da interação de 4h as células foram lavadas com PBS para remoção dos parasitos extracelulares e então fixadas com Bouin e coradas com Panótico Rápido ou deixadas por um tempo adicional de 24h e posteriormente fixadas e coradas. As lamínulas coradas foram montadas em lâminas com Entelan e a infecção foi avaliada por meio de análise ao Microscópio Óptico de Campo Claro Olympus BX 40. A atividade anti-*Toxoplasma* foi determinada pela porcentagem de células infectadas para as diferentes

concentrações testadas, verificando se houve inibição da invasão dos taquizoítos em cultura de células humanas no ensaio de 4h. Já no ensaio de 4h + 24h foi avaliado o número de taquizoítos por vacúolo. Foi aplicado aos resultados o teste estatístico One Way ANOVA. Em cada experimento foram avaliadas 2 lamínulas por cada condição de tratamento realizado em duplicata.

4.7 Ensaio do pré-tratamento de taquizoítos extracelulares e invasão celular

Taquizoítos da cepa RH recém egressados foram contados como descrito no item 4.5. Após a contagem os taquizoítos foram distribuídos em microtubos de 1,5 ml de forma a terem uma proporção de 10:1 parasitos/célula. Aos microtubos foram adicionados os peptídios nas concentrações utilizadas no ensaio anterior. Os taquizoítas extracelulares foram incubados com os peptídios por 2h em estufa com atmosfera de CO_2 5% a 37ºC e então centrifugados e lavados com meio RPMI por 2 vezes para retirada dos peptídios. Após a lavagem, os taquizoítas pré-tratados ressuspendidos em meio RPMI completo foram postos para interagir por 4h com culturas de NDHF contidas em lamínulas redondas em placas de 24 poços. Ao término da interação de 4h as células foram lavadas com PBS para remoção dos parasitos extracelulares e então fixadas com Bouin e coradas com Panótico Rápido ou deixadas por um tempo adicional de 24 h e posteriormente fixadas e coradas. As lamínulas coradas foram montadas em lâminas com Entelan® e a infecção foi avaliada por meio de análise ao Microscópio Óptico de Campo Claro Olympus BX 40. A atividade anti-*Toxoplasma* foi determinada pela porcentagem de células infectadas para as diferentes concentrações testadas, verificando se houve inibição da invasão dos taquizoítos em cultura de células humanas no ensaio de 4h. Foi aplicado aos resultados o teste estatístico One Way ANOVA. Em cada experimento foram avaliadas 2 lamínulas por cada condição de tratamento realizado em duplicata.

4.8 Ensaio do pré-tratamento de células NDHF e invasão

Placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro com monocamadas de células NDHF confluentes foram pré-tratadas por 24h com as concentrações não-citotóxicas dos peptídeos em estudo diluídos meio RPMI e mantidas em estufa a 37 ºC com atmosfera úmida e 5% de CO_2. Após 24h o meio contendo os peptídios foram removidos e as células foram então lavadas com meio RPMI. Após a lavagem as células foram então interagidas com taquizoítos de *T. gondii* cepa RH na proporção de 10:1 (taquizoítos/célula) por 4 horas. Ao término da interação a cultura foi lavada com PBS pH 7,4 para remoção dos parasitos extracelulares, fixadas com Bouin e coradas com kit Panótico Rápido. As lamínulas coradas foram então montadas em lâminas com Entelan e a infecção foi avaliada por meio de análise ao Microscópio Óptico de Campo Claro e contagem de ao menos 600 células por lamínula. Em todos os experimentos foram avaliadas 2 lamínulas por cada condição de tratamento e ao todo foram efetuados dois experimentos independentes. A atividade anti-*Toxoplasma* foi determinada pela porcentagem de células infectadas nas diferentes concentrações, verificando se houve diminuição do número de células infectadas. Os resultados obtidos foram avaliados utilizando o teste estatístico *One Way* ANOVA para comparação de grupos tratados versus o controle positivo.

4.9 Cálculos

As contagens de parasitos foram plotadas em Microsoft Word Excel® e para os diversos cálculos matemáticos e análises estatísticos dos resultados foi utilizado o software GraphPad Prism 8.0.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da citotoxicidade em células NDHF

Ensaios de citotoxicidade foram realizados com o uso da reação de MTS/PMS, avaliando a viabilidade celular através da conversão do sal de tetrazólio em formazan pela sucinato desidrogenase mitocondrial. Os peptídeos utilizados foram os derivados das fenilseptinas, da surfactina e da litotoxina (LyeTx1) nas concentrações de 16,5; 31; 62,5; 125; 250 µg/ml com D-Phes e L-Phes e nas concentrações de 3; 6; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 1,79; 3,58; 7,17; 14,35; 28,7; 57,4 µg/ml de LyeTx1 e surfactina, respectivamente por 96h (Tabela 1 e Figura 9). Os resultados obtidos nas análises em células NDHF mostram que tanto LyeTx1 quanto Surfactina foram citotóxicos para células apenas a partir das concentrações de 12 µg/ml e 57,4 µg/ml (incluir a porcentagem de inibição), respectivamente. Já os peptídeos derivados das fenilseptinas mostraram citotoxicidade a partir de concentrações superiors a 125 µg/ml para D-Phes e 250 µg/ml para L-Phes.

Tabela 1. Citotoxicidade de AMPs em NDHF

Conc. (µg/ml)	% Viabilidade		Conc. (µg/ml)	% Viabilidade	Conc. (µg/ml)	% Viabilidade
	Fenilseptinas			LyeTx1		Surfactina
	D-Phes	L-Phes				
15	98,2	100,0	3	100,0	0,9	100,0
31	85,0	92,4	6	84,5	1,8	100,0
62	100,0	98,0	12	8,0	3,6	100,0
125	74,7	96,7	25	0	7,2	100,0
250	13,5	84,0	50	0	14,4	100,0
-	-	-	100	0	28,7	100,0
-	-	-	200	0	57,4	9,7

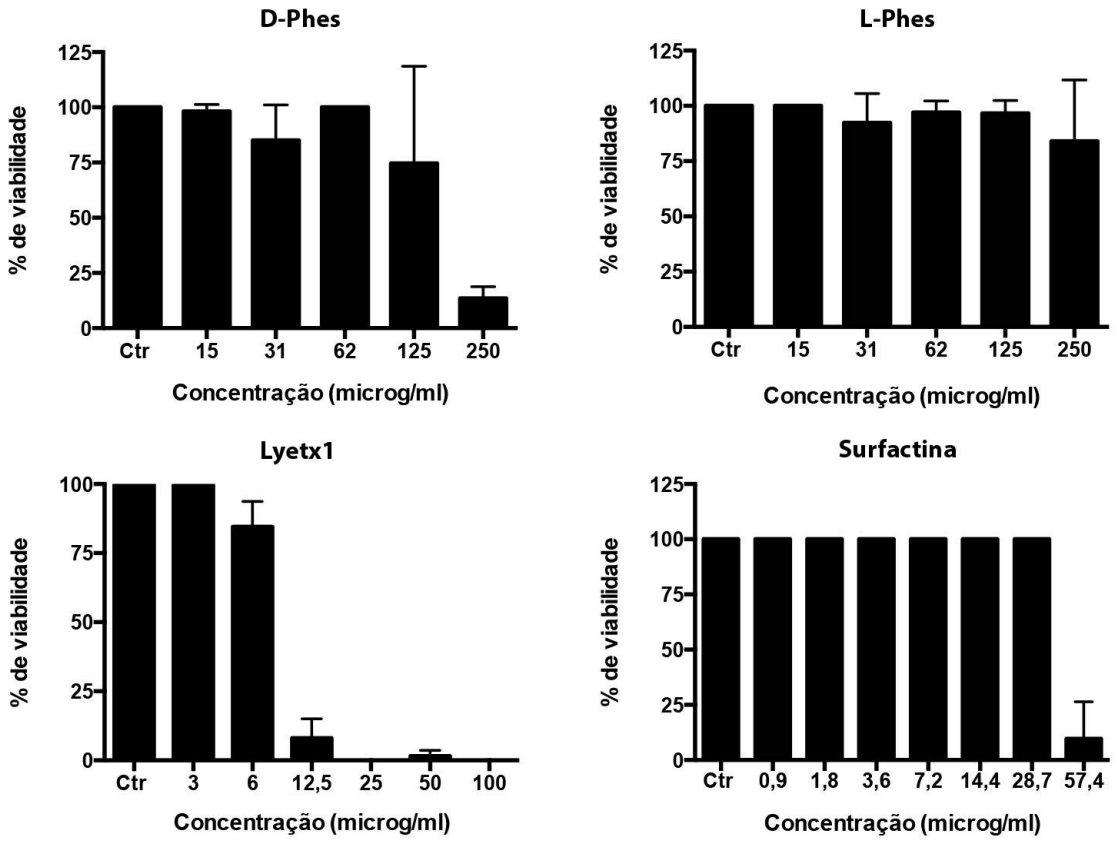

Figura 9: Efeito citotóxico da surfatina, litotoxina e das fenilseptinas em cultura de fibroblastos humano (NDHF) após 96h de tratamento. A atividade antiproliferativa em cultura de fibroblastos humano foi avaliada com ensaio de MTS/PMS, e comprova a baixa citotoxicidade dos compostos D-Phes, L-phes e da Surfactina. Os resultados representam a media ± desvio padrão de três (Phes e Surfactina) ou dois (LyeTx1) experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism 8.

5.2. Efeito antiproliferativo de peptídeos em taquizoítas da cepa RH

Os efeitos de D-Phes, L-phes, LyeTx1 e Surfactina foram testados em cultura celular de fibroblasto humano NDHF previamente infectadas com taquizoítas da cepa RH, por 4 h. Em seguida foram removidos parasitos extracelulares por lavagem e as células foram tratadas com diferentes concentrações dos peptídeos pelo periodo de 24 h. A atividade anti-*Toxoplasm*a foi determinada pelo cálculo do índice de infectividade para as diferentes concentrações testadas, verificando se houve inibição da proliferação intracelular dos taquizoítos em células NDHF. Resultados obtidos após o tratamento por 24h de taquizoítos de

T. gondii intracelulares com as maiores concentrações não tóxicas testadas mostraram que 100 µg/ml de D-Phes e L-Phes inibiram a proliferação em 36,56% e 28,1%, respectivamente; Já 3µg/ml de LyeTx1 e 28,7µg/ml de Surfactina inibiram a proliferação em 75,48% e 80,4%, respectivamente (Figura 10).

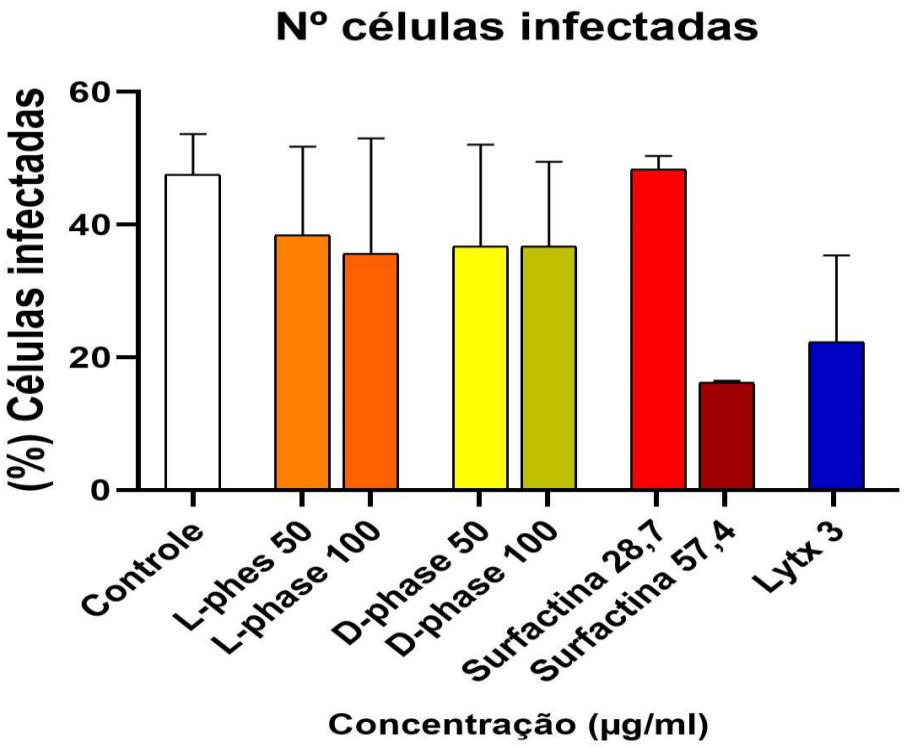

Figura 10 – Efeito antiproliferativo de D-phes, L-phes, Surfactina e LyeTx1 em taquizoítas de *T. gondii*, em células NDHF após 24 h de tratamento. LyeTx1 e Surfactina apresentaram efeito anti-*T. gondii* em concentrações de µg/ml. Os resultados representam a média ± de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism 8 – pelo teste One-Way ANOVA.

5.3 Efeito dos peptídeos antimicrobianos na invasão pelo *T. gondii*

Como um protozoário intracelular obrigatório, o processo de invasão celular e estabelecimento da infecção em uma célula hospedeira é crucial para a viabilidade do *T. gondii* no hospedeiro. E assim, também foi avaliado neste trabalho o efeito dos peptídeos na invasão celular por este protozoário usando diferentes abordagens.

Em um conjunto de experimento taquizoítos recém egressados de *T. gondii* foram postos para interagir com a célula hospedeira NDHF e incubados simultaneamente com 50 e 100 µg/ml de D-Phes e L-Phes, 3 µg/ml de LyeTx1 e 14,4 e 28,8 µg/ml de surfactina por 4h (Figura 11). Análises por microscopia óptica mostraram que 100 µg/ml de D-Phes reduziu a invasão de taquizoítos de *T. gondii* em mais de 50% em relação ao controle ($P < 0,05$) (Figura 11A). Reduções discretas na invasão também foram obtidas com 50 µg/ ml D-Phes, 100 µg/ml de L-Phes (Figura 11A) e 3 µg/ml de LyeTx1 (Figura 11B), no entanto estas diferenças não foram significativas. Em relação a surfactina, embora o tratamento com 28,8 µg/ml tenha reduzido em cerca de 40% a invasão, a diferença em relação ao controle também não foi significativa (Figura 11C).

Em um outro conjunto de experimentos foi avaliado o possível efeito dos peptídeos na célula hospedeira e sua interação com o *T. gondii*. Para tal, células NDHF foram incubadas por 24h na presença dos peptídeos. Após este período os peptídeos foram removidos e as células foram então interagidas com taquizoítos frescos de *T. gondii* em meio de cultivo sem peptídeos por 4h (Figura 4). Análises por microscopia óptica mostraram que não houve diferença na infecção da célula hospedeira em qualquer condição de tratamento com os diferentes peptídeos. Ou seja, todos os grupos de tratamento mostraram percentual de infecção semelhante ao controle (Figura 12 A-C).

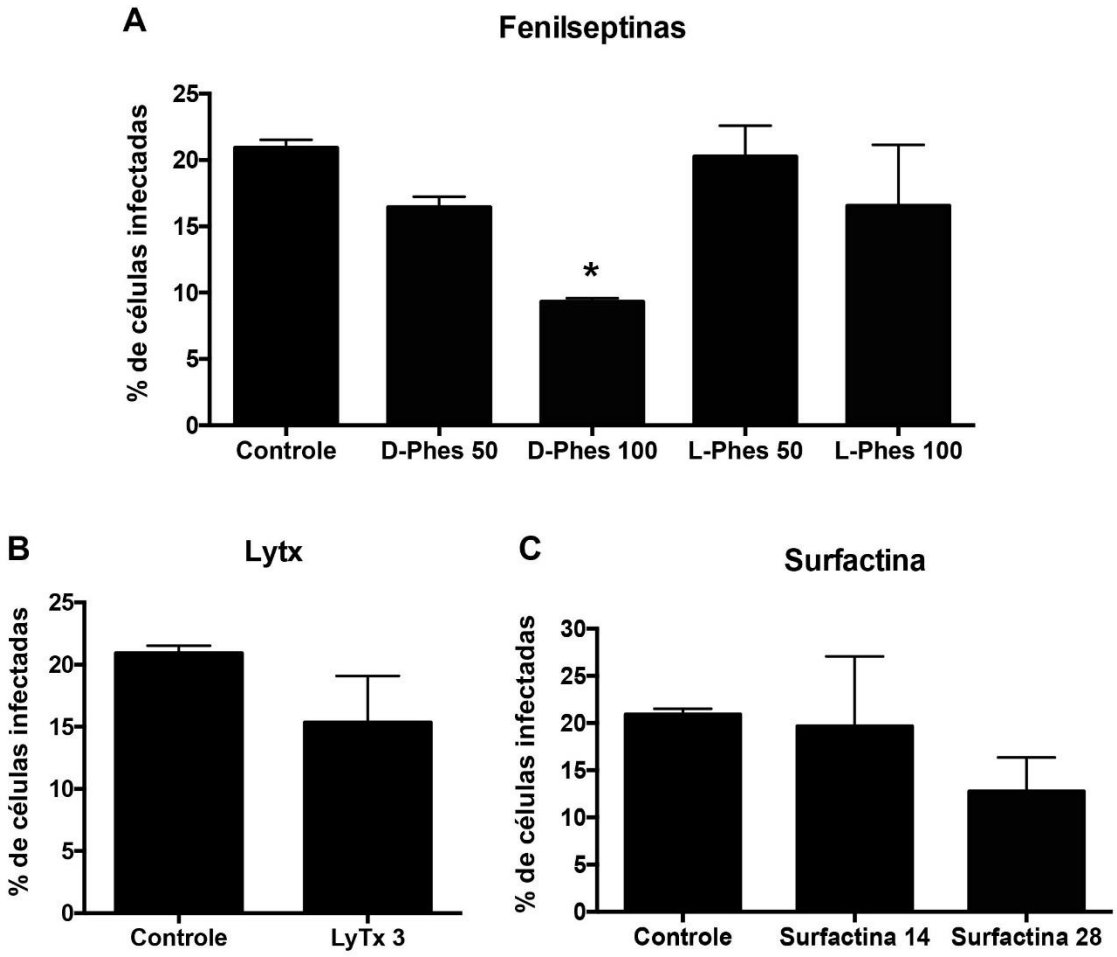

Figura 11. Efeito dos peptídeos na interação de taquizoítos com a célula hospedeira. Taquizoítos de *T. gondii* foram incubados com os peptídios fenilseptinas (A), LyeTx1 (B) e Surfactina (C) no momento de sua interação com a célula hospedeira por um período de 4h. O efeito dos peptídeos na invasão foi determinado a partir da porcentagem de células infectadas. Os experimentos foram feitos em duplicata e para cada condição experimental foram quantificadas cerca de 1200 células hospedeiras em cada réplica. *$P < 0.05$ em relação o controle.

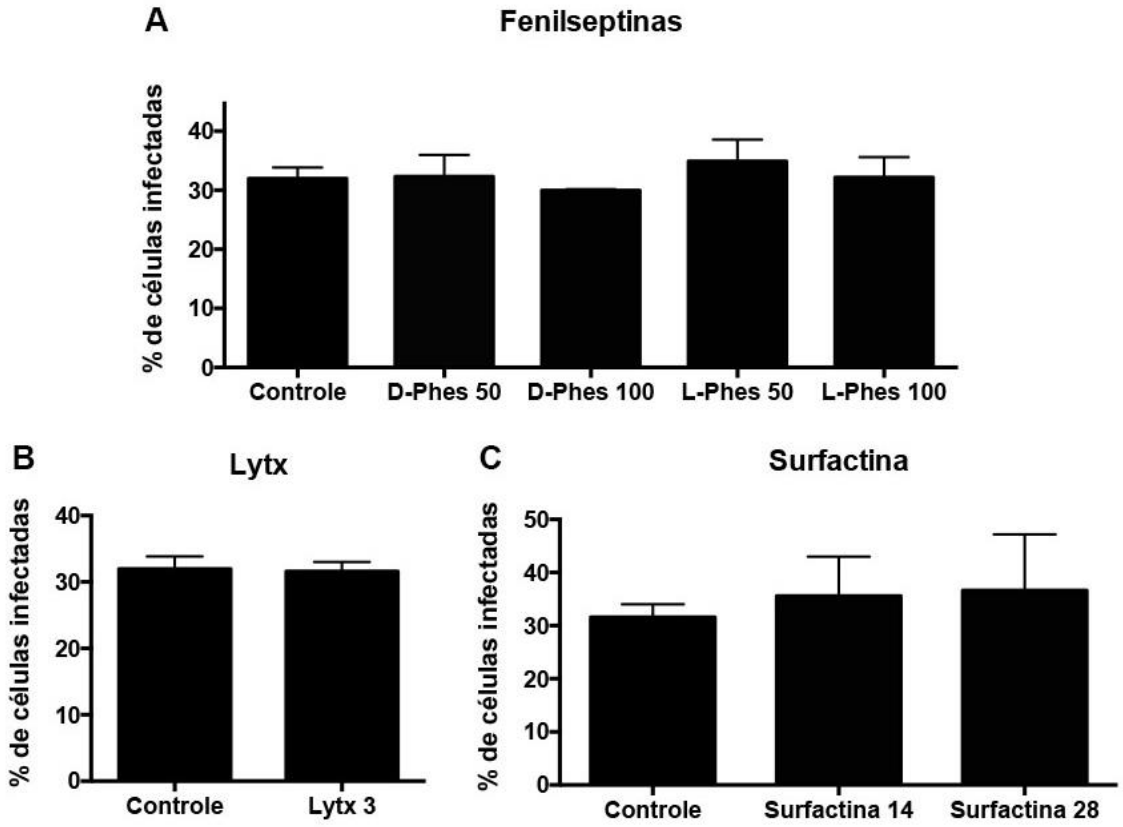

Figura 12. Efeito na invasão após o pré-tratamento da célula hospedeira por 24 h com os peptídeos. Culturas de células NDHF foram pré-tratadas por 24h com os peptídeos fenilseptinas (A), LyeTx1 (B) e Surfactina (C) e então desafiadas com taquizoítos de *T. gondii* por 4h em meio de cultivo livre dos peptídeos. O efeito na invasão foi determinado por meio de microscopia óptica a partir da quantificação de cerca de 1200 células por experimento. Os resultados representam média ± desvio padrão de dois experimentos independentes. *$P < 0.05$ em relação o controle.

De forma a verificar se o efeito observado na invasão ocasionado pela incubação com os peptídeos durante o processo de interação parasito/célula (Figura 11) era devido a um efeito direto no parasito, taquizoítos extracelulares foram tratados isoladamente por 2h com 100 µg/ml de D-Phes, 3µg/ml de LyeTx1 e 28,8 µg/ml de Surfactina. Após 2h, os taquizoítos foram lavados 2 vezes com meio de cultivo para remoção dos peptídeos e então postos para interagir por 4h com as células NDHF (Figura 13). Análises por microscopia óptica novamente mostraram que o tratamento com 100 µg/ml de D-Phes inibiu de forma significativa a invasão de *T. gondii*, reduzindo em cerca de 70% o número de células

infectadas em relação ao controle (Figura 13). Reduções discretas na invasão também foram observadas nos parasitos tratados com 3 µg/ml de LyeTx1 e 28,8 µg/ml de Surfactina, no entanto as diferenças em relação ao controle não foram significativas.

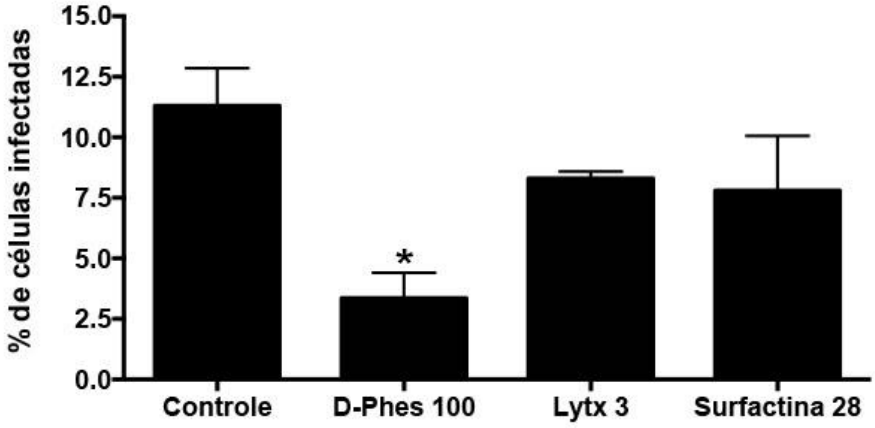

Figura 13. Efeito na invasão após o pré-tratamento de taquizoítos por 2h. Taquizoítos de *T. gondii* foram incubados com os peptídios por 2h. Após o tratamento os taquizoítos froam foram lavados para remoção dos peptídeos e então colocados para interagir com culturas de NDHF por 4h. O efeito na invasão foi determinado por meio de microscopia óptica a partir da quantificação de cerca de 1200 células por experimento. Os resultados representam média ± desvio padrão de dois experimentos independentes. *$P < 0.05$ em relação o controle.

E por fim foi verificado a viabilidade e o desenvolvimento dos parasitos intracelulares após o tratamento com os peptídeos no momento da interação com as células NDHF por 4h. Para tal foi quantificado o número de parasitos por vacúolos parasitóforos após um período de 20h sem tratamento. A partir dos resultados obtidos não foi observada nenhuma diferença significativa no número de parasitos por vacúolo nos grupos tratados em relação ao controle (Figura 14).

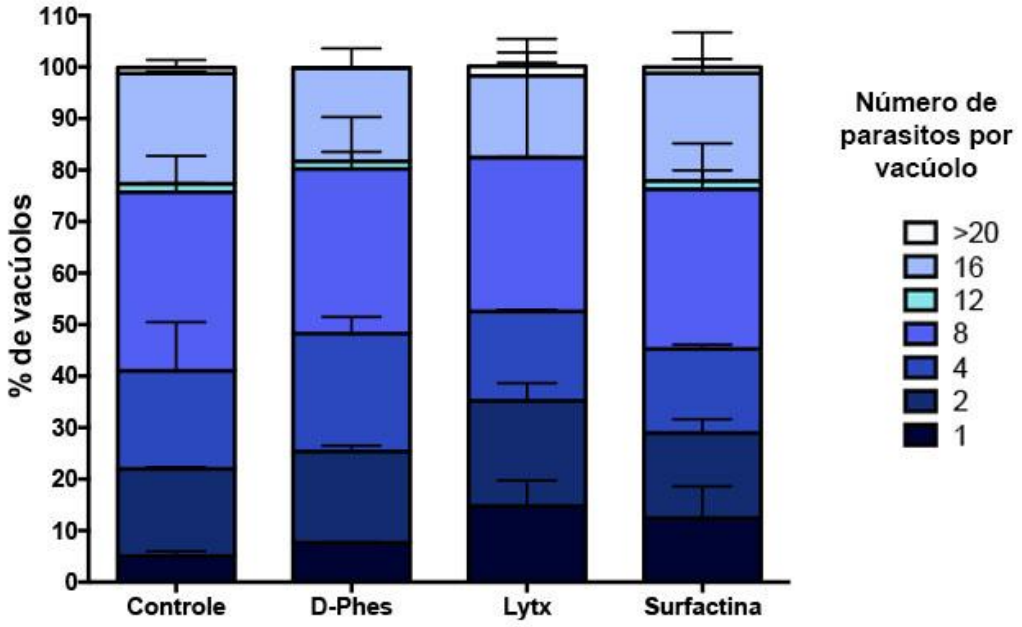

Figura 14. Efeito no desenvolvimento intracelular de taquizoítos pré-tratados com os peptídios D-Phes, LyeTx1 e Surfactina. Taquizoítos foram incubados com os peptídios por 4h no momento da interação com a célula hospedeira. Após 4h os peptídios e os parasitos extracelulares foram removidos e substituídos por meio de cultura fresco. Os parasitos intracelulares foram permitidos proliferar por 20h e então o número de parasitos por vacúolo foi quantificado. Foram avaliados no mínimo 200 vacúolos por cada condição experimental. Os resultados representam média ± desvio padrão de dois experimentos independentes.

6. DISCUSSÃO

As doenças parasitárias continuam sendo um obstáculo para o desenvolvimento social e econômico, principalmente em países de clima quente e considerados como em desenvolvimento (ou subdesenvolvidos). A Toxoplasmose é uma doença parasitária de distribuição global e é considerada um problema relevante de saúde pública em vários países do mundo, levando a complicações socioeconômicas de grande extensão e complexidade. Embora muitos esforços no controle da transmissão tenham sido bem-sucedidos, os resultados destas medidas não beneficiam diretamente os milhões de indivíduos infectados, nem tampouco os pacientes em fase aguda e crônica da doença com manifestações clínicas. A combinação de PYR-SDZ demonstra eficácia para o tratamento clínico na fase aguda, mas é ineficaz no tratamento da fase crônica da doença. Além disso, apesar da eficácia de PYR-SDZ no tratamento da fase aguda, o medicamento apresenta altas taxas de toxicidade celular nos indivíduos em tratamento e consequentemente vários efeitos adversos. Intolerância de pacientes incluindo reações de hipersensibilidade e depressão da medula são frequentemente reportados. Nesse contexto, a busca por uma terapia medicamentosa adequada ao tratamento da toxoplasmose continua a ser um desafio. Indivíduos cronicamente infectados por *Toxoplasma gondii* permanece sem alternativas de tratamento, representando grave problema que tem elevado o sofrimento de milhões de infectados em todo o mundo.

Na busca por tratamentos alternativos para a toxoplasmose, assim como outras doenças, o encontro de novas drogas com potencial efeito vem sendo feito por diversos processos, tais como triagem empírica e descobertas ao acaso, extração de princípios ativos de fontes naturais, modificação molecular de compostos já existentes, síntese de novos compostos, reposicionamento de fármacos e associação de fármacos (Korolkovas, 1982; Tempone *et al.*, 2011). Moléculas ativas extraídas de produtos naturais são utilizadas no desenvolvimento de diversos fármacos. As plantas e microrganismos cultiváveis são as

principais fontes dessas moléculas. É considerado produto natural moléculas oriundas de plantas como *Salix alba*, conhecido como salgueiro (ácido salicílico) e comercialmente como Aspirina. Outra substância natural é a artemisinina, oriunda da *Artemisia annua* e capaz de atuar no combate ao agente etiológico da malária (Robert *et al.*, 1998). Os antibióticos foram desenvolvidos a partir da descoberta das propriedades antibacterianas da penicilina-G, em 1932, fungo identificado como pertencente ao gênero *Penicillium* (Barreiro e Fraga, 2001). Moléculas extraídas de bactérias como *Streptomyces sp*, possuem amplo espectro de açao ação anti-helmíntica potente e vem sendo recomendada para o combate ao *Schistosoma mansoni* (Viergas *et al.*, 2006).

Outro exemplo de moléculas ativas provenientes de produtos naturais são os peptídeos bioativos naturais. Estudos envolvendo os peptídeos estão aumentando devido ao enorme potencial médico, biotecnológico e farmacológico. Como mencionado anteriormente, os peptídeos bioativos são componentes do sistema imune inato ou do metabolismo secundário de diferentes organismos. O interesse na pesquisa destas moléculas como potencial antimicrobiano baseia-se no amplo espectro de atividade contra microorganismos e reduzida propensão da aquisição de resistência pelos microorganismos. Assim, neste trabalho foi investigada a atividade *in vitro* de peptídeos do sistema imune da aranha *Lycosa erythrognatha* (LyeTx1), do sistema imune do sapo *Hypsibos puntactus* (D-Phes e L-Phes) e do metabolismo secundário do *Bacillus* sp (surfactina) em taquizoítos de *Toxoplasma gondii* e também a possível toxicidade em células NDHF. D-Phes e L-Phes são duas configurações naturais do peptídeo fenilseptina, identificados a partir da secreção da pele do *Hypsibos puntactus* (de Magalhães *et al.*, 2013). Já as surfactinas foram escritas primeiramente em 1968 como produtos do metabolismo secundário de bactérias do gênero *Bacillus* (Arima *et al.*, 1968), conhecidos por suas propriedades surfactantes. Além de suas propriedades surfactantes as surfactinas também têm mostrados atividades antimicrobianas e antivirais (Zanotto *et al.*,

2019). As propriedades antimicrobianas das fenilseptinas e surfactina deste estudo (molécula inédita não descrita) ainda estão sendo realizados em diferentes organismos, de forma que podemos dizer que os resultados apresentados na presente dissertação são pioneiros nesta área.

Em relação os peptídeos provenientes de venenos de aranhas, estes têm mostrado interagir com canais de íons e receptores celulares, e alguns, mostram atividade antimicrobiana (Santos *et al.,* 2016). As primeiras licotoxinas com atividade antimicrobiana foram descritas por Xu e col. no final da década de 1980 extraídas do veneno de *Lycosa singoriensis* (Xu *et al.,* 1989). Em 1998 Yan e Adams isolaram dois peptídeos a partir do veneno de *Lycosa carolinensis*: Lycotoxinas I e II. Esses AMPs mostraram atividade contra bactérias gram-negativas como *Escherichia coli* e leveduras como *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* (Yan e Adams, 1998). O efeito do peptídeo licosina-1, isolado da aranha *L. Singoriensis,* foi recentemente avaliado em *T. gondii* (Tang *et al.,* 2019). Licosina-1 foi capaz de alterar a membrana de *T. gondii* e reduzir sua viabilidade após tratamento por 2h (Tang *et al.,* 2019). Já LyeTx1 foi isolado a partir do veneno da *L. erythrognatha* (Santos *et al.,* 2010) e tem mostrado efeito contra diversas espécies de bactérias e fungos (Consuegra *et al.,* 2013), o que torna o estudo da atividade anti-*T. gondii* promissora. Além disso, diversos autores tem demonstrado o efeitos de diferentes AMP's isolados de diferentes organismos e que possuem atividade contra *T.gondii* (Tabela 2).

Tabela 2. AMP's isolados de diferentes organismos com atividade contra *T. gondii*.

Fonte	AMP	Estágio evolutivo	Tipo de inibição	Atividade inibitória (Concentração)	Toxicidade célula hospedeira
Conus californicus (Leon-Nava *et al.*, 2016)	Conotoxins-cal14.1a	Taquizoíto	Invasão	35% (10 µM)	NT[a] (até 50 µM/ 369 µg/ml) Mod[b]: HEp-2 cells 24h
				60% (50 µM)	
		Taquizoíto	Proliferação	72% (10 µM/ 73,8 µg/ml)	
Ornitoctonus huwena (Hou *et al.*, 2019)	HWVM	Taquizoíto	Invasão	54% (12,5 µg/ml)	52% (50 µg/ml) Mod: HeLa 24h
		Taquizoíto	Proliferação	45% (12,5 µg/ml)	
Lycosa singoriensis (Tang *et al.*, 2019)	Licosina 1	Taquizoíto	Invasão	57,9% (20 µM)	50% (34,7 µM/ 101 µg/ml) Mod: HFF 24h
		Taquizoíto	Proliferação	32,96% (10 µM/ 29 µg/ml)	
			Proliferação	39,84% (20 µM/ 58µg/ml)	
Haemaphysalis longicornis (Tanaka *et al.*, 2012)	Longicin P4	Taquizoíto	Invasão	90% (5 µM/ 11,6 µg/ml)	25 % (50 µM/ 115 µg/ml) Mod: J774A.1 74h
		Taquizoíto	Proliferação	78% (25 µM/ 57,8 µg/ml)	

[a] Não Tóxica

[b] Modelo de célula hospedeira

No presente trabalho, foi avaliado a atividade dos peptídeos contra as formas evolutivas de taquizoítos de *T. gondii* e também a toxicidade nas células hospedeiras utilizadas neste estudo, no caso fibroblastos humanos NDHF. De forma a selecionar concentrações não tóxicas para os ensaios antiproliferativos, foram realizados primeiramente

os ensaios citotoxicidade pelo método do MTS/PMS. Nestes ensaios foram testadas diferentes concentrações de cada peptídeo em estudo, escolhidas de acordo com a solubilidade de cada um. Dentre os peptídeos com maior efeito citotóxico nas concentrações utilizadas em células NDHF em nosso estudo, destacaram-se todas as concentrações acima de 100 µg/ml de D-Phes e 250 µg/ml L-Phes, demonstrando de D-Phes é menos tolerável do que L-Phes para NDHF. Já para LyeTx1 e Surfactina concentrações a partir de 6 µg/ml e 57,4 µg/ml, respectivamente, demonstraram toxicidade. Comparado com a lycosina-1, LyeTx1 apresentou ser menos tolerada por fibroblastos humanos, já que a primeira foi inócua aos fibroblastos em concentrações de até 7,25 µg/ml (2,5 µM) (Tang *et al.*, 2019).

Levando-se em consideração que o *T. gondii* é um protozoário intracelular obrigatório, o próximo passo foi avaliar a atividade das concentrações não-tóxicas dos peptídeos nas formas taquizoítos intracelulares. Os taquizoítos são amplamente encontrados na circulação e nos diversos tecidos do hospedeiro (com alta carga parasitária) durante a fase aguda da infecção, principalmente nas primeiras semanas, onde a produção de anticorpos é insuficiente para conter a infecção. Os peptídeos foram adicionados as culturas de NDHF após 4 h de infecção pelo *T. gondii*. Após 24 h de tratamento o efeito antiproliferativo foi avaliado, demonstrando que surfactina e LyeTx1 foram inibidores potentes da proliferação. Concentrações de 28,7 µg/ml de surfactina e 3 µg/ml de LyeTx1 inibiram a proliferação em 80,4 % e 75, 5 %, respectivamente. Já fenilseptinas mostraram efeito moderado, o tratamento com 100 µg/ml de D-Phes e L-Phes inibiu a proliferação em 36,56 % e 28,1 %, respectivamente.

Por ser um parasito intracelular obrigatório, o processo de invasão celular é uma etapa crucial para a viabilidade e manutenção da infecção pelo *T. gondii* e assim, também foi verificado a atividade dos peptídeos no momento da interação das células NDHF com os taquizoítos de *T. gondii* por 4h. Os resultados obtidos demonstraram que 100 µg/ml de D-

Phes foi o único peptídeo capaz de afetar a invasão em 55,6 % de forma significativa ($P < 0,05$). Embora 28,7 µg/ml surfactina tenho reduzido a invasão em 39,1 %, este resultado não apresentou significância estatística ($P > 0,05$). Discreta inibição da invasão (26,6 %) também foi obtido com o tratamento de 3 µg/ml de LyeTx1, porém não apresentou diferença significativa com o controle.

Para o processo de invasão pelo *T. gondii*, o parasito precisa reconhecer receptores na superfície da célula hospedeira. De forma a verificar se o efeito dos peptídeos no processo de invasão poderia ser devido ao bloqueio de sítios de reconhecimento pelo parasito ou alterações da superfície da célula hospedeira, células NDHF foram pré-tratadas por 1h antes da interação com os taquizoítos. Os resultados obtidos demonstram que os peptídeos não promoveram qualquer alteração na superfície da célula hospedeira, de forma que a taxa de invasão nas células pré-tratadas foi semelhante ao das células não-tratadas. E assim, de forma a confirmar o efeito direto dos peptídeos em *T. gondii* em inibir a invasão, taquizoítos extracelulares foram incubados por 2 h com os peptídeos e então postos para invadir por células NDHF. Neste experimento o tratamento simultâneo com 100 µg/ml de D-Phes ocasionou uma redução significativa de 70,4 % da invasão, efeito maior do que o obtido nos experimentos de incubação simultânea com a célula hospedeira (55,6 %). Uma possível explicação para este resultado seria que o efeito de D-Phes em *T. gondii* não é imediato e, por isso, permitiria a invasão de taquizoítos nos momentos iniciais da interação com a célula hospedeira no ensaio de incubação simultânea. Ao contratário, o tratamento de taquizoítos extracelulares com 28,7 µg/ml de surfactina resultou em inibição discretamente menor. Já o tratamento de taquizoítos extracelulares com 3 µg/ml de LyeTx1 resultou em inibição de 26,6 % da invasão, resultado semelhante ao obtido nos ensaios de incubação simultânea, de forma que se pode inferir que LyeTx1 exerce um efeito direto e imediato em *T. gondii*.

E por fim, de forma a verificar se os taquizoítos capazes de invadir após a co-incubação com os peptídeos estavam viáveis foi analisado a capacidade de proliferação dos mesmos por 24h. A contagem do número de parasitos por vacúolo não demonstrou qualquer diferença entre os parasitos tratados e controle, de forma que se pode concluir que os parasitos capazes de invadir não tiveram sua viabilidade afetada.

7. CONCLUSÕES

- Dentre os 4 peptídeos estudados, todos apresentaram atividade contra taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

- Os resultados do ensaio proliferativo mostraram que a surfactina e LyeTx1 foram as únicas que afetaram significativamente a proliferação intracelular do parasito.

- D-Phes inibe de forma significativa a invasão de taquizoítos *T. gondii*.

REFERÊNCIAS

Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, Dardé ML. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 2004; 34:1185–1196.

Alday PH.; Doggett. JS. Drugs development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. *Drug Design, Development and Therapy.* 2017; 11: 273-293.

Amendoeira, MRR.; Camillo-Coura, LF. Uma breve revisão sobre toxoplasmose na gestação. Scientia Medica. 2010; 20, (1): 113-119,

Andreu D, Merrifield RB, Steiner H, e Boman HGN. Terminal analogs of cecropin A: synthesis, antibacterial activity, and conformational properties. Biochemistry. 1985. 24(7), p. 1683–1688.

Aoki W, Ueda M. Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics.*Pharmaceuticals*. 2013. 6, 1055-1081.

Aponte CAH, Sanchez JS, Hernández VQ, Romero AR, Balderas C, Possani LD, Gurrola GB. Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of *Vaejovis mexicanus.Toxicon.* 2011; 57: 84–92.

Araújo AC, Villela MM, Sena-Lopes A, Farias NAR, Faria LMJ, Avila LFC; Berne MEA, Borsuk S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Toxocara canis* in a human rural population of Southern Rio Grande do Sul. *Rev Inst Med Trop.* 2018;60:e28.

Araújo-Jorge TC e Souza W. Effect of carbohydrates, periodate and enzimes in the processo f endocytosis in *Trypanosoma cruzi* by macrophages. *Acta tropica.* 1984. 41: 17-28.

Arima K, Kakinuma A, Tamura G. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1968. 31:488–494.

Auvynet C, Rosenstein Y. Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *FEBS Journal*. 2009. 276, 6497–6508.

Avelar MV, Martinez VO, Moura DL, Barros IA, Primo AAS, Duarte AO, Soares NM, Lima FWM. Association between seroprevalence of IgG anti-*Toxoplasma gondii* and risk factors for infection among pregnant women In *Climério de Oliveira Maternity.* 2017; 1-8.

Bahar, AA, e Ren D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals (Basel),* 2013. V.*6 ed*(12), p. 1543-1575.

Bajorath J. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discovery.* 2002, 1: 882–94.

Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos,* 1ª ed., Ed. Artmed: Porto Alegre, 2001.

Belá, SR. *Avaliação do antígeno SAG2A recombinante de Toxoplasma gondii como um potencial marcador diagnóstico para toxoplasmose humana aguda*. Universidade Federal de Uberlândia. 2007; 92.

Blader IJ, Coleman BI, Chen CT, Gubbles MJ. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii:* 15 Years Later. *Annual Review of microbiology.* 2015; 69 (1): 463-485.

Bossi P, Paris L, *et al.*, Severe acute disseminated toxoplasmosis acquired by an immunocompetent patient in French Guiana. *Scand J Infect Dis*. 2002; 34 (4): 311-314.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 8ed. Brasília: *Ministério da Saúde.* 2010; 444.

Brogden KA. *Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nature Reviews Microbiology.* 2005. 3(3), p. 238–250.

Carneiro AC, Andrade GM, Costa JG, Pinheiro BV, Vasconcelos-Santos DV, Ferreira, AD, et al., Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes from human congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51, 3901–3907.

Carruthers V, Boothroyd,JC. Pulling together: a integrated modelo f *Toxoplasma gondii* cell invasion. *Current Opinion in Microbiology*. 2007; 10 (1): 83-89.

Cerezo L, M Alvarez, *et al.*, Electron microscopic diagnosis of cerebral toxoplasmosis. Case report. *J Neurosurg.* 1985; 63 (3):.470-472.

Cerovsky V, Bem R. Lucifensins, the insect defensis of biomedical importance: the story behind maggot therapy. *Pharmaceuticals (Basel).* 2014.7, 251 – 264.

Chan DI, Prenner EJ e Vogel, HJ. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* 2006. *1758*(9), 1184–1202.

Chen Y, Cao L, Zhong M, Zhang Y, Han C, Li Q, Yang J, Zhou D, Shi W, He B, Liu F, Yu J, Sun Y, Cao Y, Li Y, Li W, Guo D, Cao Z, Yan H. Anti-HIV-1 activity of a new scorpion venom peptide derivative Kn2-7. *Plos one.* 2012. P.7.

Choi W, Nam H, Kwak N, Huh W, Kim Y, Kang M, Cho S, Dubey JP. Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 175, 1280–1282.

Cohen, S. N. Toxoplasmosis in patients receiving immunosuppressive therapy. *Jama.* 1970; 211: (4): 657-660.

Consuegra, J., de Lima, M. E., Santos, D., Sinisterra, R. D., and Cortés, M. E. (2013). Peptides: β-cyclodextrin inclusion compounds as highly effective antimicrobial and anti-epithelial proliferation agents. *J. Periodontol.* 84, 1858–1868.

Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham KJ, HE, W, Norton RS, Nakajima T. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator. Biochem J.* 2001; 359: 35-45.

Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham KJ, HE, W, Norton RS, Nakajima. T. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion*Pandinus imperator. Biochem.J*. 2001. 359, 35-45.

Dawson D. Foodborne protozoan parasites. *Int. J. Food Microbiol.* 2005; 103: 207–227.

de Magalhães MT, Barbosa EA, Prates MV, et al. Conformational and functional effects induced by D- and L-amino acid epimerization on a single gene encoded peptide from the skin secretion of Hypsiboas punctatus. *PLoS One*. 2013; 8(4): e59255.

De Moura L, Bahia-Oliveira LMG, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, Ramalho WM, Camargo NJ, Trevisan R, Graça RMT, Silva AJ, Moura I, Dubey JP, Garret DO. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12: 326–329.

Dedicoat M, Livesley N. Management of toxoplasmic encephalitis in HIVinfected adults (with an emphasis on resource-poor settings). Cochrane Database of Systematic Reviews. In: *The Cochrane Library.* 2010; 7.

Delhaes L, Ajzenberg D, Sicot B, Bourgeot P, Dardé ML, Dei-Cas E, Houfflin-Debarge V. Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. *Prenatal Diagnosis.* 2010; 30: 902–905.

Demar M, Ajzenberg D, Maubon D, Djossou F, Panchoe D, Punwasi W, Valery N, Peneau C, Daigre JL, Aznar C, Cottrelle B, Terzan L, Dardé ML, Carme B. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clinical Infectious Diseases.* 2007; 45: e88–95.

Derouin F. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14, (12):1089-1101.

Desmonts G, J. Couvreur. Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. Bull *NY Acad Med.* 1974; 50 (2):146-159.

Didier, E.; Fouque, E.; Taillepied, I.; Commercon, A.; *Tetrahedron Lett.* 1994, *35*, 2349.

Drugs.com. *American Society of Health-System Pharmacists*. 6 de junho de 2016. Consultado em 30 de agosto de 2016.

Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of Animals and Man. *CRC Press*, Boca Raton. 1988; 100 (3): 500-501.

Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: High prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology.* 2012; 10: 1-50.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11:267–299.

Dubey JP, Sundar, Hill D, Velmurugan GV, Bandini LA, Kwok OC, *et al.*, High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA. *Int. J. Parasitol.* 2008; 38 (8–9): 999–1006.

Dubey JP. Tissue cyst tropism in Toxoplasma gondii: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. *Parasitolgy.* 1997; 115: 15–20.

Dubey JP. Toxoplasma, Hammondia, Besniotia, Sarcocystis, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. *In Parasitic protozoa.* 1977; 101–237.

Dubey, J. P. & Frenkel, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.* 1972; 19:155–177.

Dubey, J. P. & Frenkel, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of Toxoplasma cysts. *J. Protozool.* 1976; 23: 537–546.

Dubremetz JF, Garcia-Réguet N, Conseil V, Fourmaux MN. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol.* v. 28, p. 1007-1013, 1998.

Ekins S, Williams AJ, Krasowski MD, Freundlich JS. In silicorepositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug Discov Today.* 2011 Apr;16(7-8):298-310.

Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, Gondon E, Janaud JC, Thulliez P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *Journal of Infectious Diseases.* 2009; 199: 280–285.

Elmore SA, Jones JL. *et al.* Toxoplasma gondii: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol.* 2010; 26 (4): 190-196.

Eyles DE, Coleman N. Synergistic effect of sulfadiazine and daraprim against experimental toxoplasmosis in the mouse. *Antibiot Chemother* (Northfield). 1953; 3: 483– 490.

Ferguson DJ. 2004. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *Int. J. Parasitol.* 1953; 34: 347–360.

Ferreira AM, Vitor RWA, Gazzinelli RT, Melo MN. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR RFLP. *Infect. Genet.* 2006; 6: 22–31.

Ferreira ÉC, Marchiorro AA, Guedes TA, Mota DCGA, Guilherme ALF, Araújo SM. Association between seropositivity for *Toxoplasma gondii*, scholastic development of children and risk factors for *T. gondii* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013; 107: 390-396.

Ferreira IMR, Vidal JE, De Mattos CCB, De Mattos LC, Qu D, Su C, Pereira Chioccola VL. *Toxoplasma gondii* isolates: multilocus RFLP PCR genotyping from human patients in Sao Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Exp. Parasitol.* 2011; 129: 190 –195.

Field, P. R., G. G. Moyle, *et al.* The accidental infection of a laboratory worker with *Toxoplasma gondii*. *Med J Aust.* 1972; 2 (4): 196-198.

Filisetti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita.* 2004; 40: 71-80.

Flegr J, Prandota J, Sovicková M, Israili ZH. Toxoplasmosis – A global threat. Correlation of latente toxplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS ONE.* 2014; 9(3): e90203.

Furtado JM, Smith JR, Belfort JR, Gattey D, Wintrhop KL. Toxoplasmosis: A global threat. *Journal of Global Infectious Diseases.* 2011; 3 (3): 281-284.

Gaddi PJ, Yap GS. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. *Immunol Cell Biol.* 2007; 85 (2): 155-159.

Gavin MA, Wanko T. e Jacobs L. Electron micro cope studies on reproducing and interkinetic *Toxoplasma*. *J. Protozool.* 1962. *9*; p. 222-234.

Gay-Andrieu F, Marty P, Pialat J, Sournies G, Drier de Laforte T, Peyron F. Fetal toxoplasmosis and negative amniocentesis: necessity of an ultrasound follow-up. *Prenat Diagn.* 2003; 23: 558–560.

Gebreyes WA, *et al.*, The global one health paradigm: Challenges and opportunities for tackling infectious diseases at the human, animal, and environment interface in low-resource settings. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8:e3257.

Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology.* 2007; 1: 1-33.

Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. Cent. Eur. *J. Biol.* 2007. Ed 2, p. 1–3310.2478/s11535-007-0010-5.

Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC. Success and virulence in Toxoplasma as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science.* 2001; 294: 161–165.

Grigg ME, Sundar N. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. International *Journal for Parasitology*. 2009; 39: 925–933.

Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quimica Nova.* 2010. V. 33, ed. 3. P. 667-679.

Guo X, Ma C, Du Q, Wei R, Wang L, Zhou M, Chen T, Shaw C. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: Evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. *Biochimie.* 2013. 95, 1784-1794.

Hakimi MA, Bougdour A. Toxoplasma's ways of manipulating the host transcriptome via secreted effectors. *Current Opinion in Microbiology.* 2015; 26: 24-31.

Hall SM. Congenital toxoplasmosis. *Bmj.* 1992; 305 (6848): 291-297.

Hamdani N, Daban-Huard C, Lajnef M, Richard JR, Delavest M, Godin O, Le Guen E, Vederine FE, Lépine JP, Jamain S, Houenou J, Le Corvoisier P, Aoki M, Moins-Teisserenc H, Charron D, Krishnamoorthy R, Yolken R, Dickerson F, Tamouza R. and Leboyer, M.

Relationship between Toxoplasma gondii infection and bipolar disorder in a French sample. *Journal of Affective Disorders.* 2013; 148: 444–448.

Harris PWR, Yang SH, Molina A, Lopez G, Middleditch M, Brimble MA. Plant Antimicrobial Peptides Snakin-1 and Snakin-2: ChemicalSynthesis and Insights into the Disulfide Connectivity.*Chemistry a European Journal*. 2014. 20, 1–10.

Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Ver.* 2001; 14(4): 659-688.

Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim. Health Res.* 2005; 6 (1): 41–61.

Holland GN e Lewis KG. An update on current practices in the management of ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol.* 2002. v.134, n.1, Jul, p.102-14.

Hou S, Liu Y, Tang Y, Wu M, Guan J, Li X, Jiang L. Anti-*Toxoplasma* gondii effect of two spider venoms in vitro and in vivo. *Toxicon.* 2019. v166. P. 9–14.

Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* 1995; 172: 1561–1566.

Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity.* 1996; 64 (12): 5193-5198.

Innes EA, Bartley PM, Buxton D, Katzer F. Ovine toxoplasmosis. *Parasitology.* 2009; 136 (14): 1887-1897.

Izadphanah, A e Gallo, RL Antimicrobial peptides. *Journal American Acad. Dermatol.* St Louis. 2005. V. 52, p. 381-390.

Jones KE, *et al.*, Global trends in emerging infectious diseases. *Nature.* 2008; 451: 990–993.

Joynson DH, Wreghitt TJ. Toxoplasmosis: a comprehensive clinical guide. Cambridge, UK: *Cambridge University Press.* 2001.

Kaplan JE, C. Benson, *et al*,. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV. *Open Forum Infect Dis.* 2009; 58:1-207.

Kawazoe U, Mineo JR. *Toxoplasma gondii*. In: Neves, DP, de Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. *Parasitologia humana.* 12a ed. São Paulo: Atheneu. 2011; 18: 163-172.

Kessl JJ, Lange BB, Merbitz-Zahradnik T, Zwicker K, Hill P, Meunier B, Palsdottir H, Hunte C, Meshnick S, Trumpower B L. Molecular basis for Atovaquone binding to the cytochrome bc1 complex. J Biol Chem 2003; 278:31312-31318.

Khan A, Fux B, Su C, Dubey JP, Darde ML, Ajioka JW, Rosenthal BM. and Sibley LD. Recent transcontinental sweep of Toxoplasma gondii driven by a single monomorphic chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007; 104: 14872–14877.

Kimball AC, Kean, *et al.* Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 4,048 obstetric patients. Am *J Obstet Gynecol.* 1971; 111(2): 211-218.

Krueguer WS; Hilborn ED, Converse RR, Wade TJ. Drinking water source and human *Toxoplasma gondii* infection in the United States: a cross-sectional analysis of NHANES date. *BMC Public Health*, United States. 2014; 14 (711): 1471-2458.
Lamarque MH, Roques M, Kong-hap M, Tonkin ML, Rugaramabu G, Marq JB, Penarete-Vargas DM, Boulanger MJ, Soldati-Favre D, Lebrun M. Plasticity and redundancy among AMA-RON pairs ensure host cell entry off *Toxoplasma* parasites. *Nature Communications.* 2014; 5 (1): 1-13.

Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 103: 11423–11428.

Lemos F. Um ano após surto de toxoplasmose ser confirmado em Santa Maria, ainda não há laudo sobre contaminação. Acesso em 21 mai 2019. Disponível em: <https://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/noticia/2019/04/19/um-ano-apos-surto-de toxoplasmose-ser-confirmado-em-santa-maria-ainda-nao-ha-laudo-sobre contaminacao.ghtml>

Lewies A, Wentzel JF, Jacobs G, Du Plessis L.H. The Potential Use of Natural and Structural Analogues of Antimicrobial Peptides in the Fight against Neglected *Tropical Diseases. Molecules.* 2015. Ed 20. P. 15392–15433.

Liesenfeld O, Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in the setting of AIDS. In: Bartlett JG, Merigan TC, Bolognesi D, eds. *Textbook of AIDS medicine.* 1999; 2: 225–259.

Lohner K, Prenner EJ. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimic systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; 1462: 141-156.

Manak MM, Moshkoff DA, Nguyen LT, Meshki J, Tebas P, Tuluc F, Douglas SD. Anti-HIV-1 activity of the neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant and synergistic interactions with other antiretrovirals. AIDS. 2010 Nov 27;24(18):2789-96.

Mangoni ML, Mcdermott AM, Zasloff M. Antimicrobial peptides and wound healing: Biological and therapeutic considerations. *Experimental Dermatology***,** 2016; 25(3): 167–173.

Mansour, S. C., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. W. (2014). Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections. *Journal of Peptide Science, 21(5), 323–329.*

Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. Curr. Opin. Pharmacol. 2006. Ed 6, p. 468–472. 10.1016.

Maubon D, Ajzenberg, *et al.* What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis? *Trends Parasitol.* 2008; 24, (7): 299-303.

McAuley J, Boyer KM, Patel D, *et al.* Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: the Chicago collaborative treatment trial. *Clin Infect Dis.* 1994; 18**:** 38–72.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 1999; 5: 607–625.

Melo MB, Jensen KDC, S aeij JPJ. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatoryresponse. *Trends in Parasitology.* 2011; 27 (11): 487-495.

Montazeri M, Sharif M, Sarvi S, Mehrzadi S, Ahmadpour E, Daryani A. A systematic review of *in vitro* and *in vivo* activities of anti-*Toxoplasma* drugs na compounds (2006-2016). *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8 (25): 1-31.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004; 363: 1965 1976.

Montoya JG, Remington J. S. Studies on the serodiagnosis of toxoplasmic lymphadenitis. *Clin Infect Dis.* 1995; 20 (4): 781-789.

Morisset, S., F. Peyron, *et al.* Serotyping of Toxoplasma gondii: striking homogeneous pattern between symptomatic and asymptomatic infections within Europe and South America. *Microbes Infect.* 2008; 10 (7): 742-747.

Nasr IA, Ahmed F, Pullishery F, El-Ashram S, Ramaiah VV. Toxoplasmosis and anti-*Toxoplasma* effects of medicinal plant extracts-A mini-review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 2016; 9 (8): 730-734.

Neto EC, Amorim F, Lago EG. Estimativa da distribuição regional da toxoplasmose congênita no Brasil a partir dos resultados de triagem neonatal. *Scientia Medica.* 2010; 20 (1): 64-70.

Nicole C, Manceaux I. Sur un protozoaire nouveau du *gondii*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences.* 1909; 148: 369-372.

Okada, M e Natori, S. Primary structure of sarcotoxin I, na antibacterial proteins from the culture médium of hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. *Journal. Biology. Chem.* 1998. P. 263, 17112.

Oliveira TC. Avaliação dos efeitos *in vitro* **e** *in vivo* do extrato total de *Artemisia annua L*. no controle da infecção aguda por *Toxoplasma gondii*. Uberlândia. 2007; 91.

Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications of pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol.* 2009; 39: 1385-1394.

Pappas-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Orefice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg. Infect. Dis*. 2003; 9: 55–62.

Paquet C, Yudin MH. Toxoplasmosis in pregnancy: prevention, screening, and treatment. *J Obst Gynaecol Can.* 2013.

Pearce BD, Kruszon-Moran D, Jones, JL. 2012. The relationship between *Toxoplasma gondii* infection and mood disorders in the third National Health and Nutrition Survey. *Biological Psychiatry*. 2012; 72: 290–295.

Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su CPopulation structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil**.** *Int J Parasitol.* 2008; 38: 561–569.

Peters BM, Shirtliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules or Future Drugs? *PLoS Pathog.* 2010. ed6(10) e1001067.

Petersen EG. Vesco, *et al.* What Do We Know About Risk Factors for Infection in Humans with Toxoplasma gondii and How Can We Prevent Infections? *Zoonoses Public Health.* 2009.

Pomares C, Ajzenberg D, Bornard L, Bernardin G, Hasseine L, Dardé ML, Marty P. Toxoplasmosis and horse meat, France. *J Emerg Infect Dis.* 2011; 17:1327–1328.

Porter SB, Sande M. Toxoplasmosis of the central nervous system in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *N Engl J Med.*1992; 327: 1643–1648.

Prado AAF, Almeida GF, Gontijo LS, Torres MLM. Toxoplamose: O que o profissional da saúde deve saber. *Enciclopédia Biosfera.* 2011; 7 (12): 1-30.

Pushpanathan M, Gunasekaran P, Rajendhran J. Antimicrobial Peptides: Versatile Biological Properties. *International Journal of Peptides.* 2013.

Rajendran C, Su C, Dubey JP. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infect Genet Evol.* 2012; 12: 359–368.

Remington JP, Thulliez P, *et al.* Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2004; v.42, n.3, Mar, p.941-5.

Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In*: Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant.* Remington, JS.; Klein, JS.; Wilson, CB.; Baker, CJ., editors. Elsevier Saunders; Philadelphia. 2006; 947-1091.

Remington JS. Cavanaugh EN. Isolation of the encysted form of Toxoplasma gondii from human skeletal muscle and brain. *N Engl J Med.* 1965; 273(24): 1308-1310.

Remington JS. Toxoplasmosis in the adult. Bull N Y *Acad Med.* 1974; 50 (2): 211-27.
.
Robert-Gangneux F, Dardé M. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25 (2): 264–296.

Roscia G, Falciani C, Bracci L, Pini A. The development of antimicrobial peptides as new antibacterial drugs. Current Protein and Peptide Science. 2013.14, 641-649.
Ruskin J, Remington JS. Toxoplasmosis in the compromised host. *Ann Intern Med.* 1976; 84 (2): 193-199.

Sabin AB, Warren J. Therapeutic effectiveness of certain sulfonamides on infection by an intracellular protozoon (Toxoplasma). *Proc Soc Exp Biol Med.* 1942; 51:19 –23.

Sabin AB. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (Toxoplasma). *Science.* 1948; 10 (108): 660-663.

Saez NJ, Senff S, Jensen JE, Er SY, Herzig V, Rash LD, King GF. Spider-Venom peptides as therapeutics. *Toxins.* 2010. 2, 2851-2871.

Santos DM, Verly RM, Piló-Veloso D, et al. LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider Lycosa erythrognatha. *Amino Acids*. 2010;39(1):135–144.

Santos DM., Reis PV e Pimenta, AMC. (). "Antimicrobial peptides in spider venoms," in *Spider Venoms*, eds P. Gopalakrishnakone, G. A. Corzo, M. E. de Lima, and E. Diego-García (Dordrecht: Springer). 2016. 361–377.

Shai Y e Oren Z. From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides.* 2001. *22*(10), 1629–1641.

Sheffield HG., e. Melton ML**.** The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 1968; 54**:** 209–226.

Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature.* 1992; 359: 82–85.

Siegel, S. E., M. N. Lunde, *et al.* Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. *Blood.* 1971; 37 (4): 388-394.

Silveira C. et al. A follow-up study of Toxoplasma gondii infection in southern Brazil. *Am J Ophthalmol*, 2001. v.131, n.3: p.351-354.

Slavin, M. A., J. D. Meyers, *et al. Toxoplasma gondii* infection in marrow transplant recipients: a 20 year experience. *Bone Marrow Transplant.* 1994; 13 (5): 549-557.

Steiner H, Hultmark D, Engström A, Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. Nature. 1981. P. 292:246-248.

Stray-Pedersen B. A prospective study of acquired toxoplasmosis among 8,043 pregnant women in the Oslo area. *Am J Obstet Gynecol.* 1980; 136 (3): 399-406.

Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé ML, Zhu XQ, Ajioka JW, Rosenthal BM, Dubey JP, Sibley LD. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012; 109: 5844–5849.

Suzuki Y, Conley FK, Remington JS. Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 1989; 159, 790–794.

Suzuki Y, Joh K. Effect of the strain of *Toxoplasma gondii* on the development of toxoplasmic encephalitis in mice treated with antibody to interferon- gamma. *Parasitol.* 1994; 80: 125–130.

Swisher CN, Boyer K, McLeod R. Congenital toxoplasmosis. *Semin Pediatr Neurol* 1994; 1**:** 4–25.

Tang Y, Hou S, Li X, et al. Anti-parasitic effect on Toxoplasma gondii induced by a spider peptide lycosin-I. *Exp Parasitol*. 2019;198:17–25.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000; 30: 1217–1258.

Tenter, A. M. Toxoplasma gondii in animals used for human consumption. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 (2): 364-369.

Tieleman DP. The molecular basis of electroporation. BMC Biochem. 2004. 5: 1-12,
Torrey EF, Bartko JJ, Lun ZR. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophrenia Bulletin.* 2007; 33, 729–736.

Vale N, Aguiar L, Gomes P. Antimicrobial peptides: A new class of antimalarial drugs? Front. Pharmacol., 2014, 5, 275.

Vallochi AL, Muccioli C, Martins MC, Silveira C, Belfort J Jr, Rizzo LV. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. *Am J Ophthalmol* 2005. *139*: p. 350-351.

Viegas Jr, C.; Bolzani, V. da S.; Barreiro, E. J.; *Quim. Nova* 2006, *29*, 326.

Vitaliano SN, Mendonça GM, Sandres FA, Camargo JS, Tarso P, Basano SA, et al. Epidemiological aspects of *Toxoplasma gondii* infection in riverside communities in the Southern Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015; 48: 301-306.

Wallon M, Liou C, Garner P, Peyron F. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *BMJ.* 1999; 318: 1511–1514.

Who.Waterborne zoonoses: identification causes and control. DA. Cotruvo Já Rees G, Bartram J, Carr R, Cliver Do, Craun Gf, Gannon Vpj. 2004; 2010.

Wilson M, Remington JS, *et al.* Evaluation of six commercial kits for detection of human immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. The FDA Toxoplasmosis Ad Hoc Working Group. *J Clin Microbiol.* 1997; 35 (12): 3112-3115.

Xu K, Ji Y, Qu X (1989) Purification and characterization of an antibacterial peptide from venom of Lycosa singoriensis. *Acta Zool Sin* 35:300–305.

Yan L, Adams ME (1998) Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider Lycosa carolinensis. *J Biol Chem* 273:2059–2066.

Yolken RH, Bachmann S, Ruslanova I, Lillehoj E, Ford G, Torrey EF, Schroeder J. Antibodies to Toxoplasma gondii in individuals with first-episode schizophrenia. *Clinical Infectious Diseases.* 2001; 32: 842–844.

Yunes, R. A.; Cechinel Filho, V.; Em *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*; Yunes, R. A.; Calixto, J. B., eds.; 1ª ed.; Ed. Argos: Chapecó, cap. 1; V1.; *Quim. Nova* 2001, *24*, 147.

Zanotto AW, Valério A, de Andrade CJ, Pastore GM. New sustainable alternatives to reduce the production costs for surfactin 50 years after the discovery. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103(21-22):8647–8656.

Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicelular organisms. *Nature*. 2002; 415 (6870): 389-395.

Zhang L e Gallo RL. (2016). *Antimicrobial peptides. Current Biology*, 26(1), R14–R19.