

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE CEPAS DE  
*Toxoplasma gondii* OBTIDAS DE CASOS HUMANOS DE TOXOPLASMOSE  
CONGÊNITA NO ESTADO DE MINAS GERAIS FRENTE AOS FÁRMACOS DE  
SEGUNDA ESCOLHA NO TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE**

**GIULIA CAROLINE DANTAS VIEIRA**

**BELO HORIZONTE**

**2023**

**GIULIA CAROLINE DANTAS VIEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE CEPAS DE  
*Toxoplasma gondii* OBTIDAS DE CASOS HUMANOS DE TOXOPLASMOSE  
CONGÊNITA NO ESTADO DE MINAS GERAIS FRENTE AOS FÁRMACOS DE  
SEGUNDA ESCOLHA NO TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Parasitologia.

**Área de concentração:** Protozoologia

**Orientadora:** Professora Dr<sup>a</sup> Érica dos Santos Martins Duarte

**BELO HORIZONTE**

**2023**

043

Vieira, Giulia Caroline Dantas.

Caracterização da suscetibilidade in vitro e in vivo de cepas de *Toxoplasma gondii* obtidas de casos humanos de toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais frente aos fármacos de segunda escolha no tratamento da toxoplasmose [manuscrito] / Giulia Caroline Dantas Vieira. – 2023.

85 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Professora Dr<sup>a</sup> Érica dos Santos Martins Duarte.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. *Toxoplasma*. 3. Toxoplasmose Congênita. 4. Virulência. I. Duarte, Érica dos Santos Martins. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**DISSERTAÇÃO 447/02/2023**

**TÍTULO: "Caracterização da suscetibilidade in vitro e in vivo de cepas de *Toxoplasma gondii* obtidas de casos humanos de toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais frente aos fármacos de segunda escolha no tratamento da toxoplasmose".**

**ALUNA: GIULIA CAROLINE DANTAS VIEIRA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROTOZOOLOGIA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **dez de março de 2023**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

**Júlia Gatti Ladeia Costa**

UEMG

**Luis Henrique Franco**

UFMG

**Erica dos Santos Martins Duarte** - Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 10 de março de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Erica dos Santos Martins Duarte, Professora do Magistério Superior**, em 10/03/2023, às 19:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luis Henrique Franco, Professor do Magistério Superior**, em 13/03/2023, às 11:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Julia Gatti Ladeia Costa, Usuária Externa**, em 14/03/2023, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2099238** e o código CRC **97C4EC78**.

---

Projeto Desenvolvido no Laboratório de Quimioterapia de Protozoários Egler Chiari do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Esse trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa/CNPq, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aos meus pais, Maria da Guia Dantas Vieira e Antônio Murilo Vieira, que nunca mediram esforços para investir nos meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a realização deste sonho e por iluminar meus passos.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em nome da coordenadora Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Hélida Monteiro de Andrade, pela imensa oportunidade para o desenvolvimento e realização deste trabalho.

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Érica dos Santos Martins Duarte por ser um exemplo em minha vida acadêmica, por todo o conhecimento compartilhado, pela disponibilidade e atenção durante o processo de orientação e por não medir esforços para que seus alunos consigam se desenvolver e evoluir na ciência.

Aos meus pais, Maria e Antônio, que sempre acreditaram no meu potencial mesmo que este me levasse para um caminho longe, fisicamente, deles. Sempre incentivaram meus estudos e não mediram esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos. Amo vocês!

Ao Hugo Campos pelo apoio na reta final do mestrado e por toda motivação transmitida a mim.

Aos amigos do mestrado, Carol e João, por tamanho apoio e incentivo.

Aos amigos que fiz durante o mestrado em Belo Horizonte, por transformarem esta cidade em meu lar.

À querida Rosálida Estevan Nazar Lopes, que mais que um técnica de laboratório, foi uma mãe para mim. Obrigada pela paciência, receptividade, auxílio técnico e conselhos.

Aos meus colegas do Laboratório de Quimioterapia de Protozoários Egler Chiari pelas colaborações realizadas.

À Luísa Mourão Dias Magalhães, do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP) do ICB/UFMG, pela colaboração durante os ensaios moleculares do projeto.

À Nathalie Sena, pelos anos de ensino durante a graduação, por me introduzir ao mundo da parasitologia e por me incentivar a ingressar na área através do mestrado.

Meu sincero agradecimento a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a construção dessa dissertação.



“A ciência e a vida cotidiana não  
podem e não devem ser separadas.”

Rosalind Franklin

## RESUMO

No Brasil, a toxoplasmose tem soroprevalência que varia de 40 a 80% em indivíduos adultos. Atualmente, o tratamento padrão-ouro para a toxoplasmose consiste na combinação de SDZ e PYR e medicamentos alternativos como SMT, TMP, CLN e ATV podem também ser usados. Há relatos de efeitos adversos e falhas de tratamento devido à resistência do parasito, principalmente no Brasil. Estudos com isolados na América do Sul mostraram que as cepas circulantes nesta região diferem consideravelmente daquelas circulantes na Europa e América do Norte, caracterizando-as como atípicas. Assim, a grande diversidade de cepas pode estar associada a ampla distribuição geográfica, fauna e recombinação de cepas clonais de forma sexuada e a diversidade genética entre as linhagens da América do Sul pode ser a razão das diferenças no padrão de suscetibilidade ao tratamento. Estudos anteriores relataram quatro cepas atípicas de *T. gondii* com suscetibilidade diminuída a SDZ e PYR. Portanto, o objetivo deste estudo foi estudar a suscetibilidade *in vivo* e *in vitro* dessas cepas atípicas (TgCTBr4, TgCTBr11, TgCTBr17 e TgCTBr23) frente os fármacos alternativos utilizados no tratamento da toxoplasmose. Foram realizados ensaios *in vivo* usando camundongos suíços fêmeas infectados i.p. com 10.000 taquizoítos. Os camundongos distribuídos em grupos foram tratados por 10 dias com diferentes dosagens e associações de SDZ, PYR, SMT, TMP, CLN e ATV. Para ensaios *in vitro*, foram realizados testes para avaliação do efeito antiproliferativo dos fármacos ao *T. gondii* e testes de invasão e proliferação. O tratamento *in vivo* utilizando a associação de SDZ e PYR foi eficaz apenas na cepa TgCTBr11, bem como o tratamento com CLN foi positivo apenas nas cepas TgCTBr11 e TgCTBr23. Os animais sobreviventes dos grupos tratados com PYR 6,26 + SDZ 20 e SMT 200 + TMP 200 mg/kg/dia da cepa TgCTBr11 não apresentaram a presença de cistos no cérebro e IgG positivo para *T. gondii*. Nos ensaios antiproliferativos *in vitro* bem como ensaios *in vivo*, a cepa TgCTBr4 não respondeu bem ao tratamento utilizando SDZ e PYR, porém, a associação de SMT e TMP pode vir a ser utilizado por auxiliarem na diminuição de proliferação do parasito. O uso da ATV em concentração mais alta auxiliou na diminuição da proliferação dos parasitos nos ensaios *in vitro* de ambas as cepas, com exceção da TgCTBr4. Além disso, as cepas TgCTBr11, TgCTBr17 e TgCTBr23 apresentam uma suscetibilidade ao uso de SDZ e PYR, podendo utilizar-se desses fármacos para o tratamento da toxoplasmose nesses casos.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*; Cepas atípicas; Padrão de suscetibilidade; Toxoplasmose congênita.

## ABSTRACT

In Brazil, toxoplasmosis has a seroprevalence that varies from 40 to 80% in adults. Currently, the gold standard treatment for toxoplasmosis is the combination of SDZ and PYR and alternative drugs such as SMT, TMP, CLN and ATV can also be used. There are reports of adverse effects and treatment failures due to the resistance of the parasite, mainly in Brazil. Studies with isolates in South America showed that the strains circulating in this region differ considerably from those circulating in Europe and North America, characterizing them as atypical. Thus, the great diversity of strains may be associated with the wide geographic distribution, fauna and sexual recombination of clonal strains, and the genetic diversity among the strains of South America may be the reason for the differences in the pattern of susceptibility to treatment. Previous studies have reported four atypical strains of *T. gondii* with decreased susceptibility to SDZ and PYR. Therefore, the aim of this study was to study the in vivo and in vitro susceptibility of these atypical strains (TgCTBr4, TgCTBr11, TgCTBr17 and TgCTBr23) to alternative drugs used in the treatment of toxoplasmosis. In vivo assays were performed using female Swiss mice infected i.p. with 10,000 tachyzoites. Mice divided into groups were treated for 10 days with different dosages and associations of SDZ, PYR, SMT, TMP, CLN and ATV. For in vitro assays, tests were performed to evaluate the antiproliferative effect of drugs against *T. gondii* and invasion and proliferation tests. The in vivo treatment using the association of SDZ and PYR was effective only in the TgCTBr11 strain, as well as the treatment with CLN was positive only in the TgCTBr11 and TgCTBr23 strains. Surviving animals in the groups treated with PYR 6.26 + SDZ 20 and SMT 200 + TMP 200 mg/kg/day of the TgCTBr11 strain did not show the presence of cysts in the brain and positive IgG for *T. gondii*. In in vitro antiproliferative assays as well as in vivo assays, the TgCTBr4 strain did not respond well to treatment using SDZ and PYR, however, the association of SMT and TMP may be used as they help to reduce parasite proliferation. The use of ATV at a higher concentration helped to reduce the proliferation of parasites in the in vitro assays of both strains, with the exception of TgCTBr4. In addition, the TgCTBr11, TgCTBr17 and TgCTBr23 strains are susceptible to the use of SDZ and PYR, and these drugs can be used to treat toxoplasmosis in these cases.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*; Atypical strains; Pattern of susceptibility; Congenital toxoplasmosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida do <i>T. gondii</i> .....	18
<b>Figura 2:</b> Via de síntese do folato .....	26
<b>Figura 3:</b> Estrutura química dos fármacos utilizados para o tratamento da toxoplasmose .....	27
<b>Figura 4:</b> Delineamento experimental <i>in vivo</i> da infecção por cepas atípicas de <i>T. gondii</i> .....	37
<b>Figura 5:</b> Delineamento experimental <i>in vitro</i> da infecção por cepas atípicas de <i>T. gondii</i> .....	43
<b>Figura 6:</b> Curva de sobrevivência de camundongos suíços inoculados pela via intraperitoneal com $10^4$ taquizoítos das cepas atípicas de <i>T. gondii</i> .....	48
<b>Figura 7:</b> Comparação da curva de sobrevivência de camundongos suíços inoculados pela via intraperitoneal com $10^4$ taquizoítos das cepas atípicas de <i>T. gondii</i> . .....	49
<b>Figura 8:</b> Número de cistos cerebrais nos camundongos sobreviventes .....	54
<b>Figura 9:</b> Curva padrão de REP-529 para a detecção de DNA de <i>T. gondii</i> para a cepa atípica TgCTBr11 .....	57
<b>Figura 10:</b> Curva padrão de REP-529 para a detecção de DNA de <i>T. gondii</i> para a cepa atípica TgCTBr23 .....	58
<b>Figura 11:</b> Quantificação da carga parasitária por qPCR em tecido cerebral de camundongos infectados com $10^4$ taquizoítos via intraperitoneal (i.p.) da cepa atípica de <i>T. gondii</i> TgCTBr11 .....	59
<b>Figura 12:</b> Quantificação da carga parasitária por qPCR em tecido cerebral de camundongos infectados com $10^4$ taquizoítos via intraperitoneal (i.p.) da cepa atípica de <i>T. gondii</i> TgCTBr23 .....	60
<b>Figura 13:</b> Taxa de invasão celular de cepas atípicas de <i>T. gondii</i> provenientes de isolados humanos de toxoplasmose congênita .....	61
<b>Figura 14:</b> Proliferação de cepas atípicas de <i>T. gondii</i> provenientes de isolados humanos de toxoplasmose congênita no período de 16 horas .....	62
<b>Figura 15:</b> Proliferação de cepas atípicas de <i>T. gondii</i> provenientes de isolados humanos de toxoplasmose congênita no período de 24 horas .....	63
<b>Figura 16:</b> Avaliação do efeito antiproliferativo de cepas atípicas de <i>T. gondii</i> provenientes de isolados humanos de toxoplasmose congênita frente aos fármacos alternativos utilizados no tratamento da toxoplasmose .....	64
<b>Figura 17:</b> Avaliação do efeito antiproliferativo de cepas atípicas de <i>T. gondii</i> provenientes de isolados humanos de toxoplasmose congênita frente aos fármacos SDZ e PYR .....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Isolados de cepas de <i>T. gondii</i> provenientes de casos humanos de toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais (segundo Carneiro et al., 2013) .....	35
<b>Tabela 2:</b> Mediana de sobrevivência (dias) de camundongos infectados com as cepas TgCTBr4, TgCTBr11, TgCTBr17 e TgCTBr23 tratados por via oral por 10 dias com os diferentes fármacos e acompanhados por 42 dias .....	50
<b>Tabela 3:</b> Presença de taquizoítos no lavado peritoneal e <i>imprinting</i> de pulmão de camundongos sobreviventes infectados com a cepa TgCTBr4 após os 42 dias de acompanhamento .....	51
<b>Tabela 4:</b> Presença de taquizoítos no lavado peritoneal e <i>imprinting</i> de pulmão de camundongos sobreviventes infectados com a cepa TgCTBr11 após os 42 dias de acompanhamento .....	51
<b>Tabela 5:</b> Presença de taquizoítos no lavado peritoneal e <i>imprinting</i> de pulmão de camundongos sobreviventes infectados com a cepa TgCTBr17 após os 42 dias de acompanhamento .....	52
<b>Tabela 6:</b> Presença de taquizoítos no lavado peritoneal e <i>imprinting</i> de pulmão de camundongos sobreviventes infectados com a cepa TgCTBr23 após os 42 dias de acompanhamento .....	52
<b>Tabela 7:</b> Pesquisa de anticorpos IgG positivo para toxoplasmose através da realização de ELISA e RIFI em camundongos sobreviventes infectados com a cepa TgCTBr4 .....	55
<b>Tabela 8:</b> Pesquisa de anticorpos IgG positivo para toxoplasmose através da realização de ELISA e RIFI em camundongos sobreviventes infectados com a cepa TgCTBr11 .....	55
<b>Tabela 9:</b> Pesquisa de anticorpos IgG positivo para toxoplasmose através da realização de ELISA e RIFI em camundongos sobreviventes infectados com a cepa TgCTBr17.....	56
<b>Tabela 10:</b> Pesquisa de anticorpos IgG positivo para toxoplasmose através da realização de ELISA e RIFI em camundongos sobreviventes infectados com a cepa TgCTBr23 .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATV – Atovaquona

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEBIO – Centro de Bioterismo

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CLN – Clindamicina

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa

DHFR – diidrofolato redutase

DHPS – diidropteroato sintase

DMSO – dimetil sulfóxido

DPI – Dias após a infecção

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

i.p. – intraperitoneal

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

NHDF – *Normal Human Dermal Fibroblast-neo*

OPD – o-fenilenodiamino

PABA – Ácido para-aminobenzóico

PBS – *Phosphate buffer solution*

PCR-RFLP – *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorfism*

PYR – Pirimetamina

qPCR – Reação em cadeia da Polimerase em tempo real

REP-529 – Elemento repetitivo do genoma de *T. gondii* de 529pb

RH – *soluble tachyzoite antigen*

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SDZ – Sulfadiazina

SMT – Sulfametoxazol

TgCTBr – Tg = *Toxoplasma gondii*, CT = toxoplasmose congênita e Br = Brasil

TMP – Trimetoprim

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1. BIOLOGIA E CICLO DE VIDA DO <i>T. GONDII</i> .....	17
1.2. EPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE NO BRASIL .....	19
1.3. ESTRUTURA POPULACIONAL E PADRÃO DE VIRULÊNCIA DE CEPAS DE <i>T. GONDII</i> NO MUNDO E NO BRASIL .....	20
1.4. PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA TOXOPLASMOSE .....	22
1.5. QUIMIOTERAPIA ANTI- <i>TOXOPLASMA</i> .....	25
1.6. RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA ANTI- <i>TOXOPLASMA</i> .....	29
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. OBJETIVOS .....	34
3.1. OBJETIVO GERAL .....	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE <i>T. GONDII</i> .....	35
4.2. ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	36
4.2.1. CAMUNDONGOS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	36
4.2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> .....	36
4.2.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	37
4.2.4. PREPARO DOS FÁRMACOS .....	38
4.2.5. PESQUISA DE CISTOS CEREBRAIS E <i>IMPRINTING</i> DE PULMÃO.....	39
4.2.6. EXAME SOROLÓGICO - <i>ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY</i> (ELISA) .....	39
4.2.7. EXAME SOROLÓGICO - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) .....	40
4.2.8. PESQUISA DE CARGA PARASITÁRIA TECIDUAL POR PCR EM TEMPO REAL (qPCR) .....	40
4.2.8.3. PCR EM TEMPO REAL (qPCR).....	42
4.2.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	42
4.3. ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....	42
4.3.1. CULTIVO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS NHDF .....	42
4.3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i> .....	43
4.3.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>T. GONDII</i> ..	44
4.3.4. FÁRMACOS.....	45

4.3.5. TESTES DE INVASÃO E PROLIFERAÇÃO EM CEPAS ATÍPICAS DE <i>T. GONDII</i> .....	45
4.3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	46
5. RESULTADOS .....	47
5.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS FÁRMACOS <i>IN VIVO</i> EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS INFECTADOS COM CEPAS ATÍPICAS DE <i>T. GONDII</i> .....	47
5.1.1. MORTALIDADE E MORBIDADE EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS INFECTADOS COM TAQUIZOÍTOS DE QUATRO CEPAS DE <i>T. GONDII</i> E TRATADOS .....	47
5.1.2. PRESENÇA DE TAQUIZOÍTOS NO LAVADO PERITONEAL E <i>IMPRINTING</i> DE PULMÃO DE CAMUNDONGOS SOBREVIVENTES INFECTADOS COM CEPAS ATÍPICAS DE <i>T. GONDII</i> .....	50
5.1.3. PRESENÇA DE CISTOS NO CÉREBRO DE CAMUNDONGOS SOBREVIVENTES INFECTADOS COM CEPAS ATÍPICAS DE <i>T. GONDII</i> .....	52
5.1.4. PESQUISA DE ANTICORPOS IGG ANTI- <i>T. GONDII</i> POR ELISA E RIFI EM CAMUNDONGOS SOBREVIVENTES APÓS 42 DIAS .....	54
5.1.5. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA NO CÉREBRO DOS CAMUNDONGOS SOBREVIVENTES INFECTADOS PELAS CEPAS ATÍPICAS DE <i>T. GONDII</i> TgCTBr11 E TgCTBr23 POR QPCR .....	56
5.1.5.1. PADRONIZAÇÃO DO MARCADOR MOLECULAR REP-529 EM DNA DE TAQUIZOÍTOS DE <i>T. GONDII</i> PARA CURVA PADRÃO.....	56
5.1.5.2. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA EM TECIDO CEREBRAL .....	58
5.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS FÁRMACOS <i>IN VITRO</i> EM CÉLULAS INFECTADAS COM AS DIFERENTES CEPAS ATÍPICAS DE <i>T. GONDII</i> .....	61
5.2.1. TESTES DE INVASÃO E PROLIFERAÇÃO DE CEPAS ATÍPICAS DE <i>T. GONDII</i> .....	61
5.2.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>T. GONDII</i> .....	63
6. DISCUSSÃO .....	67
7. CONCLUSÕES .....	74
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXOS .....	84



## 1. INTRODUÇÃO

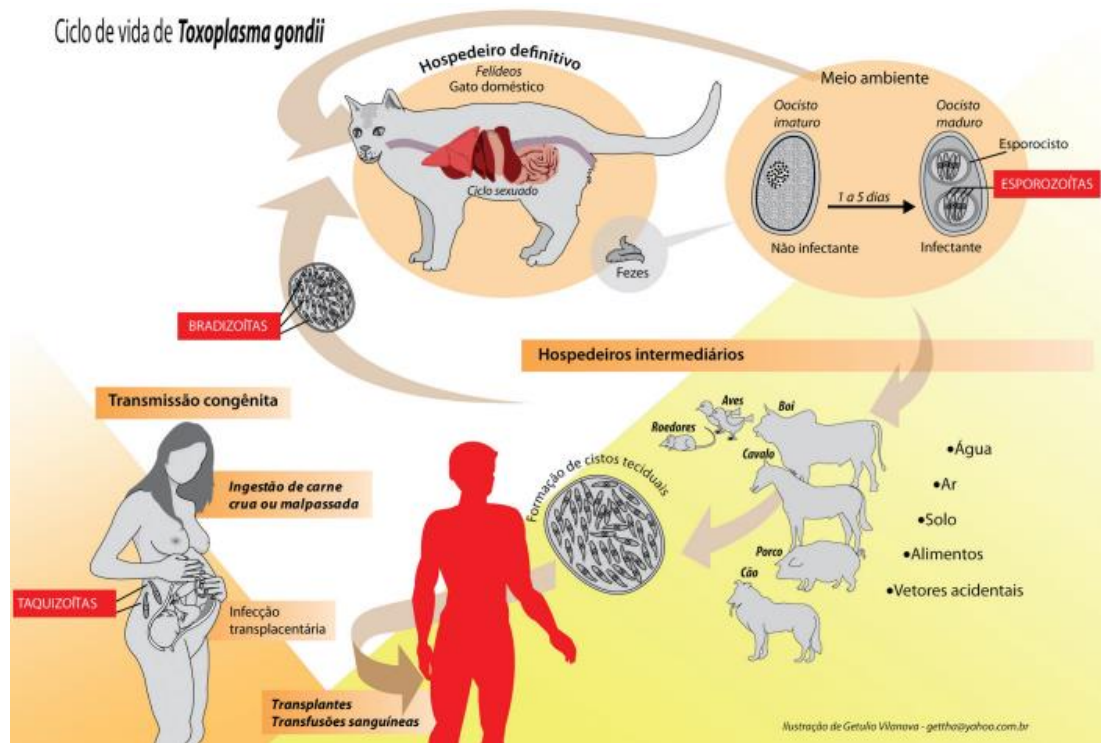
### 1.1. BIOLOGIA E CICLO DE VIDA DO *T. gondii*

*Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1908) é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Conoidasida, sub-classe Coccidia, ordem Eucoccidiida, sub-ordem Eimeriina, família Sarcocystidae e sub-família Toxoplasmatinae (ADL et al., 2012). Este protozoário é responsável por causar a toxoplasmose e possui uma vasta distribuição geográfica (JACOBS; LUNDE, 1957).

Existem três formas infectantes do *T. gondii* que participam do ciclo biológico: os oocistos, bradizoítos e taquizoítos (DUBEY, 2008). A transmissão da toxoplasmose ocorre através da ingestão de alimentos, como verduras e legumes, e água contaminada contendo oocistos. Além disso, pode ocorrer transmissão através da ingestão de cistos contendo bradizoítos presentes na carne crua ou mal passada. Uma outra forma de transmissão é por meio dos taquizoítos pela via transplacentária, transfusões sanguíneas e contato com secreções (WALCHER; COMPARSI; PEDROSO, 2017; MONTAZERI et al., 2018; CASTRO et al., 2019).

O ciclo biológico do *T. gondii* é heteróxico, constituído por dois hospedeiros (definitivo e intermediário) apresentando diferentes fases de desenvolvimento do parasito, sendo estas sexuada e assexuada (Figura 1). Os hospedeiros definitivos são os felídeos, como o gato doméstico e gatos selvagens, e os hospedeiros intermediários são diversos animais de sangue quente, como o ser humano, roedores, aves, boi, cavalo, cães, entre outros. A fase sexuada ocorre nas células epiteliais do intestino delgado de felinos, como o gato doméstico, que consistem no hospedeiro definitivo do parasito. Após a ingestão de cistos ou oocistos por esses hospedeiros, há a liberação de bradizoítos e esporozoítos, respectivamente, que infectam o epitélio intestinal desses felinos e se multiplicam por merogonia, originando 5 tipos de merozoítos (DUBEY, 2010). Ao final da merogonia, o rompimento da célula infectada libera o merozoíto tipo E que, ao infectar novas células, irão se diferenciar em gametócitos para a posterior formação dos gametas, microgamonte e macrogamonte/macrogameta, e posterior produção de zigotos que darão origem ao oocisto, que são então liberados nas fezes dos felídeos ainda imaturos. No meio ambiente, esses oocistos passam pela maturação através do processo de esporulação, processo este que perdura pelo tempo de um a cinco dias e recebe influência de diversos fatores como umidade e disponibilidade de oxigênio. Ao fim da maturação, estes oocistos possuem dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada. Estes

oocistos maduros permanecem viáveis no meio ambiente de 12 a 18 meses, e contribuem diretamente para disseminação do parasito para outros hospedeiros definitivos ou intermediários (RORMAN et al., 2006; BARBOSA; MUNO; MOURA, 2014; MINEO; VITOR, 2016).



**Figura 1:** Ciclo de vida do *T. gondii*. Fonte: Barbosa, Muno e Moura (2014) adaptado de Moura, Amendoeira e Barbosa, 2009.

A fase assexuada ocorre tanto nos hospedeiros intermediários como nos definitivos e é iniciada a partir da ingestão das formas evolutivas infectantes. Nos hospedeiros intermediários, os oocistos ou cistos teciduais, acidentalmente ingeridos, passam pelo processo de digestão no trato gastrointestinal do hospedeiro. Nos enterócitos, células epiteliais do intestino delgado, os bradizoítos e esporozoítos liberados invadem enterócitos e células da lâmina própria, respectivamente. Após a invasão da célula hospedeira, se diferenciam em taquizoítos e multiplicam-se por endodiogenia. Após o estabelecimento da infecção no intestino, os taquizoítos acessam a corrente sanguínea e linfática, permitindo a disseminação para outras partes do corpo (ARTIGAS et al., 2012). Sob a pressão do sistema imune e influência de citocinas e quimiocinas, participantes do processo inflamatório desencadeado pela infecção, ocorre a conversão da fase aguda para a fase crônica, na qual os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos e inicia-se a formação dos cistos teciduais que possuem parede cística rica em polissacarídeos, fina e elástica, permitindo uma maior resistência e protegendo os bradizoítos de alterações ambientais e resposta imune do hospedeiro (KIEFFER;

WALLON, 2013; MEDEIROS, 2019). Os cistos se instalam preferivelmente no cérebro, músculo esquelético, miocárdio e retina. Em pacientes com distúrbios imunológicos, pode ocorrer a conversão de bradizoítos a taquizoítos e ruptura desses cistos, levando a reativação da infecção (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; ARTIGAS et al., 2012).

## 1.2. EPIDEMIOLOGIA DA TOXOPLASMOSE NO BRASIL

Considerando ser uma zoonose amplamente difusa, estima-se que cerca de 30% da população mundial esteja infectada com *T. gondii* (MAENZ et al., 2014). No Brasil, a toxoplasmose possui uma soroprevalência variando de 40 a 80% entre indivíduos adultos (FRANCISCO et al., 2006). Ademais, a transmissão congênita possui uma frequência de acometimento podendo variar de 3 a 20 casos a cada 10.000 recém-nascidos (MARZOLA, 2021). A ocorrência da toxoplasmose de forma sintomática é incomum, ocorrendo em sua maioria entre indivíduos imunocomprometidos, fetos e recém-nascidos (MONTAZERI et al., 2018).

Há relatos que a infecção por *T. gondii* acontece mais frequentemente em climas mais quentes e de baixa altitude devido a favorecer as condições de esporulação e manutenção dos oocistos no ambiente. Além disso, existe uma distribuição homogênea entre grupos étnicos que pode estar mais associado aos hábitos alimentares e condições sanitárias que por diferenças genéticas entre populações. No Brasil existe uma taxa de soropositividade mais alta quando comparado a países da Europa, principalmente entre povos indígenas e indivíduos em vulnerabilidade social. Outro ponto relatado é que grupos socioeconômicos mais altos tendem a possuir baixas taxas de soroprevalência (DUBEY; BEATTIE, 1988; BÓIA et al., 2008; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; JONES; DUBEY, 2014).

Estudos anteriores demonstram um caso de toxoplasmose congênita a cada 770 nascidos vivos no Estado de Minas Gerais. Destes recém-nascidos, aproximadamente 80% apresentavam diagnóstico de retinocoroidite em pelo menos um olho (VASCONCELOS-SANTOS et al., 2009).

Uma pesquisa avaliando a vulnerabilidade socioeconômica associada a toxoplasmose no sul do Brasil verificou que há uma prevalência de soropositividade para toxoplasmose em população vulnerável, em torno de 73%, idosos (87,97%) e gestantes (60,6%). Dessa forma, os autores atribuíram um maior risco para exposição ao *T. gondii* a esses grupos, associando ainda o fator de risco a falta de acesso à educação, baixa renda familiar e baixas condições

sanitárias. Além disso, hábitos alimentares também influenciam na prevalência da toxoplasmose nestes grupos. Gestantes, por ser um grupo de risco importante devido as consequências da transmissão vertical, como distúrbios reprodutivos, sintomas neurológicos graves e deficiência visual e auditivo das crianças, tende a ser um grupo a receber mais atenção com relação aos demais estudados (MAREZE et al., 2019).

Tendo em vista se tratar de uma doença que atinge a cronicidade, a melhor forma de prevenir é evitar a infecção pelo parasito. Para tanto, é imprescindível boas condições de higiene, saneamento básico e acesso a informações quanto ao manuseio e preparo dos alimentos para o combate da parasitose (WALCHER; COMPARSI; PEDROSO, 2017; MOURA et al., 2019).

### **1.3. ESTRUTURA POPULACIONAL E PADRÃO DE VIRULÊNCIA DE CEPAS DE *T. gondii* NO MUNDO E NO BRASIL**

Os primeiros estudos de caracterização populacional de *T. gondii* ocorreram predominantemente com cepas isoladas na Europa e América do Norte. Nestes estudos, *T. gondii* apresentou uma baixa diversidade genética com predomínio de três linhagens clonais classificadas como cepas tipo I, II e III (DARDÉ; BOUTEILLE; PESTRE-ALEXANDRE, 1992; HOWE; SIBLEY, 1995). Por este motivo, o *T. gondii* passou a ser considerado por alguns anos um parasito de estrutura populacional clonal (HOWE; SIBLEY, 1995; BOOTHROYD; GRIGG, 2002). A virulência destes isolados foram associadas ao grau de letalidade em camundongos. Dessa forma, a linhagem clonal tipo I foi classificada como virulenta em camundongos, na qual a infecção por apenas um parasito pode causar a morte do hospedeiro, enquanto as linhagens do tipo II e III são consideradas avirulentas, possibilitando uma resposta imunológica do hospedeiro frente a infecção e possibilidade de cronificação da doença. Em humanos, a toxoplasmose se comporta de forma semelhante, sendo associada a forma aguda ao genótipo tipo I, tipo II ocorrendo de forma mais frequente em pacientes com o sistema imune comprometido e o tipo III ocorrendo mais comumente em animais e, quando em humanos, é o tipo mais associado a forma assintomática da doença (HOWE; SIBLEY, 1995).

Estes resultados demonstraram que o ciclo de vida nos felinos, únicos hospedeiros onde ocorre a reprodução sexuada do parasito, ocorreria de forma rara em países da América do Norte e Europa (CARNEIRO et al., 2013). No entanto, estudos posteriores com isolados na América do Sul, especialmente o Brasil, mostraram que as cepas circulantes nesta região se

diferem consideravelmente, tanto em estrutura quanto em diversidade genética, daquelas circulantes na Europa e América do Norte (KHAN et al., 2006; BELFORT et al., 2007; DUBEY et al., 2007). Assim, as cepas da América do Sul foram classificadas como atípicas. Tamanha diferença de diversidade de cepas entre as regiões pode estar associada a distribuição de felinos selvagens entre as regiões (CARNEIRO et al., 2013). É considerado que o Brasil detém a maior quantidade de espécies de felinos selvagens do continente americano (CAÑON-FRANCO; ARAÚJO; GENNARI, 2013). Esta diversidade de felinos silvestres, incluindo aqueles mantidos em centros de conservação, como zoológicos, pode auxiliar no estabelecimento da variação e disseminação de cepas de *T. gondii* em território brasileiro, tornando-os um importante foco de transmissão e manutenção do parasito no ambiente (CARNEIRO et al., 2013). Assim, a grande diversidade de cepas pode estar associada a ampla distribuição geográfica, fauna e recombinação de cepas clonais de forma sexuada (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; KHAN et al., 2006; DE MELO FERREIRA et al., 2006; DUBEY, 2008; DELHAES et al., 2010; CARNEIRO et al., 2013; SHWAB et al., 2014; SILVA et al., 2014). Em contrapartida, a implicação da não exclusividade do uso da reprodução sexuada para a disseminação do parasito, que pode também ocorrer através da reprodução assexuada nos hospedeiros definitivos e intermediário, poderia ter contribuído para a manutenção do ciclo em regiões de pouca diversidade genética (BOOTHROYD; GRIGG, 2002).

Grande parte dos estudos de genotipagem de *T. gondii* utilizam a técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorfism*) para a caracterização de cepas, por se tratar de um método rápido, reprodutível e de desenvolvimento simples, sendo a metodologia para tipagem genética mais utilizada atualmente (AJZENBERG; DUMETRE; DARDÉ, 2005; SU; ZHANG; DUBEY, 2006). Através desta técnica foi possível identificar isolados de cepas atípicas de *T. gondii* (SU; ZHANG; DUBEY, 2006; CARNEIRO et al., 2013). No Brasil, foram identificados quatro genotípicos principais de linhagens clonais típicos do território brasileiro, mas que se diferem das 3 linhagens clonais clássicas do *T. gondii*, os tipos BrI (virulento), BrII (virulento intermediário), BrIII (avirulento) e BrIV (virulento intermediário) (PENA et al., 2008). Apesar desta classificação, é sabido que a diversidade genética e presença de outros genótipos no Brasil tende a ser superior ao já classificado, uma vez que estas cepas são frequentemente encontradas, mas não são prevalentes quando comparadas às cepas da América do Norte e Europa. Além disso, é considerado que as cepas oriundas da América do Sul podem estar associadas a uma maior

virulência quando comparadas aos isolados circulantes em outras regiões do mundo (BRANDÃO et al., 2006; CAVALCANTE et al., 2007; DE LIMA BESSA; DE ALMEIDA VITOR; DOS SANTOS MARTINS-DUARTE, 2021).

Andrade e colaboradores (2012) analisaram a prevalência da toxoplasmose em ovinos e realizou a caracterização molecular de isolados obtidos de animais de produção no Estado do Rio Grande do Norte. Neste estudo foi observado que, dos seis isolados obtidos, nenhum pertence ao perfil clonal mundial (I, II ou III) ou perfis clonais brasileiros (BRI, BRII, BRIII ou BRIV), sendo assim, todos os isolados são oriundos de genótipos atípicos brasileiros. Carneiro e colaboradores (2013) identificaram 27 isolados provenientes de toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais. Destes, apenas oito isolados se enquadravam na classificação previamente aplicada para cepas brasileiras, nos quais sete foram agrupados ao genótipo BRII e apenas um ao genótipo BRIII. Os demais se classificaram de maneira única, pertencentes a outros genótipos que não haviam sido descritos previamente e caracterizados majoritariamente como isolados virulentos. Somado a isso, Silva et al. (2014) realizou a caracterização molecular do *T. gondii* isolados de cães, galinhas e de casos humanos de toxoplasmose congênita que também apontou variação nos genótipos identificados nas cepas brasileiras. Dentre os 24 isolados foram identificados apenas 10 isolados que se enquadram aos genótipos clonais brasileiros (BRI, BRII e BRIII). Ao todo, foram identificados entre os isolados 12 genótipos diferentes no estudo, sendo oito deles considerados atípicos frente aos perfis clonais brasileiros e mundiais. Dessa forma, é observada uma variação que implica diretamente na real diversidade destas cepas e forte presença do ciclo sexuado do *T. gondii* em território brasileiro.

Embora a relação entre virulência em camundongos das cepas atípicas ainda não esteja bem associada as manifestações clínicas e sintomatologia em humanos de forma bem definida, uma maior gravidade da toxoplasmose é observada nos países da América do Sul, podendo essa gravidade estar associada ao grande polimorfismo genético detectado entre cepas brasileiras (CRISTINA et al., 1995; BOOTHROYD; GRIGG, 2002; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011; GILBERT et al., 2008).

#### **1.4. PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA TOXOPLASMOSE**

Alguns locais são mais comumente parasitados pelo *T. gondii*, como o sistema nervoso central, retina, placenta, tecido linfático, e tecido muscular. A entrada na célula pelo parasito é realizada a partir de penetração ativa infectando quaisquer células nucleadas do hospedeiro.

Após a penetração, o parasito reside em um compartimento chamado de vacúolo parasitóforo (VP) e, portanto, é separado do citoplasma celular por uma membrana. Neste compartimento, os taquizoítos se multiplicam-se rapidamente por endodiogenia, que consiste na produção de duas células-filha a partir de uma célula-mãe através da reprodução assexuada. Eventualmente os taquizoítos egressam da célula infectada e dá-se início a uma reação inflamatória. Os taquizoítos liberados no meio extracelular invadem novas células, amplificando a infecção e levando a destruição tecidual (SOUZA et al., 2010; BARBOSA; MUNO; MOURA, 2014).

Cerca de 20% dos pacientes imunocompetentes apresentam sintomas para a toxoplasmose. O principal sintoma é a linfadenopatia cervical e supraclavicular que consiste no aumento dos linfonodos, de forma indolor, mantendo-se aumentado por meses ou, mais raramente, anos. Outros sintomas comuns são febre, mal-estar e dores de cabeça (GÓMEZ et al., 2007).

A toxoplasmose ocular, por sua vez, está associada a 2% dos indivíduos com toxoplasmose e a infecção pós-natal é a responsável pela maior parte dos casos de comprometimento ocular (GILBERT; STANFORD, 2000). O Brasil, por sua vez, contabiliza cerca de 27% de prevalência de retinocoroidite em decorrência da toxoplasmose, podendo comprometer pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes (FERREIRA et al., 2014). Neste último grupo, em casos de necrose da retina ocular, o prognóstico não é favorável caso o tratamento não seja iniciado o mais rápido possível. Ainda assim, não existe nenhum tratamento específico para a toxoplasmose ocular (ZHANG; LIN; LU, 2018).

Mesmo se tratando de uma doença em sua maioria assintomática em pacientes imunocompetentes, a sintomatologia exibida pelos grupos de risco, como os pacientes imunocomprometidos e gestantes, varia desde sintomas leves a problemas mais graves como retinocoroidite, encefalite, pneumonite, retardo motor, aborto espontâneo, morte neonatal, parto prematuro e perda da visão (SIBLEY; MORDUE; HOWE, 1999; LOPES; BERTO, 2012). Ademais, os sintomas estão associados à forma clínica da toxoplasmose.

Pacientes imunocomprometidos, como portadores do HIV e pacientes em tratamento contra o câncer, são mais suscetíveis a apresentar sintomas para a toxoplasmose. Estima-se que 84% dos pacientes com HIV apresentam sorologia positiva para toxoplasmose, com uma maior frequência da neurotoxoplasmose, que acomete cerca de 3 a 40% dos pacientes (AUN, 2019; MELO; PAULISTA; SÁNCHEZ, 2020). Além do mais, em cerca de 95% dos pacientes ocorre a reativação da doença, nos quais os principais sintomas descritos são encefalite e

pneumonite. Outras manifestações clínicas podem estar associadas, dependendo da disseminação e gravidade da doença, tais como febre, convulsões, confusão mental, hemorragias, tosse e falta de ar (DEDICOAT; LIVESLEY, 2006; CAMPINA; QUEIROZ-FERNANDES, 2018). Quando não tratada, a doença pode atingir 100% de letalidade nesse grupo, portanto, é imprescindível que haja um acompanhamento e diagnóstico rápido (MONTOYA; BOOTHROYD; KOVACS, 2003; SANTOS; ROCHA; RAMOS, 2015).

A toxoplasmose ocular, por sua vez, representa 25% de crianças e adultos com uveíte e 35% com retinocoroidite. Esta apresentação sintomática está comumente associada à toxoplasmose congênita, se manifestando nos primeiros dias ou anos de vida da criança. No entanto, estudos recentes de Valladares e colaboradores (2020) relatam o aumento dos casos de toxoplasmose ocular pós-natal. As lesões típicas identificadas são localizadas principalmente na mácula, região no centro da retina, de forma focal, granulomatosa, necrosante e unilateral. Na toxoplasmose congênita cerca de 85% dos casos de toxoplasmose ocular são bilaterais e devido ao risco de comprometimento da visão, o tratamento deve ser iniciado assim que o diagnóstico for realizado (GÓMEZ et al., 2007). Na América do Sul, especialmente no Brasil, esta forma clínica é bastante comum. Estudos apontam cerca de 95% de ocorrência de retinocoroidite em crianças com toxoplasmose congênita (VASCONCELOS-SANTOS et al., 2009; GÓMEZ-MARÍN, 2010).

Segundo Kieffer e Wallon (2013), a toxoplasmose durante a gravidez, e consequente transmissão congênita, pode acarretar em uma série de complicações ao feto e recém-nascidos, dependendo do período de infecção. O risco de transmissão para o feto tende a aumentar de 15% nas primeiras 13 semanas para 71% nas últimas semanas de gestação, provocando danos potenciais ao sistema nervoso. Outras manifestações como abortos, parto prematuro e morte neonatal podem ocorrer. A toxoplasmose congênita possui uma prevalência entre 3 a 20 casos a cada 10.000 nascidos vivos no Brasil. Os recém-nascidos infectados nas últimas semanas de gestação tendem a apresentar uma infecção subclínica, no entanto, no Brasil este quadro tem se mostrado diferente, no qual sintomas mais graves e mais prevalentes são relatados (VASCONCELOS-SANTOS et al., 2009; MARZOLA, 2021).

Estudos mais recentes apontam que no Brasil as lesões oculares (87%) e neurológicas (53%) diagnosticadas no primeiro ano de vida são mais frequentes e mais graves quando comparado com a prevalência de lesões oculares (29%) e neurológicas (13%) em países da Europa em virtude da falta de tratamento e da presença de cepas mais virulentas no Brasil. A doença pode apresentar-se de forma multissistêmica, variando a prevalência e gravidade entre



países da América do Sul, como o Brasil, Europa Ocidental, França e Estados Unidos, podendo ocorrer hidropisia e miocardite, ou acometendo o sistema nervoso, com amplas sequelas como retardo psicomotor, convulsões, hidrocefalia, necrose do tecido, calcificação cerebral, microcefalia e toxoplasmose ocular (MALDONADO et al., 2017). As lesões oftalmológicas podem ser observadas em manifestações como microftalmia, estrabismo, catarata, entre outros (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, 2020). Portanto, é necessário a realização de testes regulares durante o pré-natal da gestante para realizar o acompanhamento e prevenir a infecção fetal ou reduzir complicações (WALLON; PEYRON, 2018). Além disso, a Portaria nº 7, de 4 de março de 2020, foi estabelecida a fim de ampliar a detecção de toxoplasmose congênita incluindo o exame no teste do pezinho, podendo ser realizado através do Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil, sendo de extrema importância o diagnóstico precoce a fim de minimizar complicações associadas a toxoplasmose ao recém-nascido.

Sabendo que a soroprevalência da toxoplasmose no mundo está associada a parâmetros socioeconômicos e culturais, é necessário o conhecimento de tendências frequentes para a aplicação de políticas públicas de saúde a fim de minimizar os danos físicos e financeiros causados pela toxoplasmose (PAPPAS; ROUSSOS; FALAGAS, 2009). Além do mais, novas estratégias para diagnóstico e, principalmente, novos tratamentos devem ser estudados e aprimorados (MCAULEY, 2014).

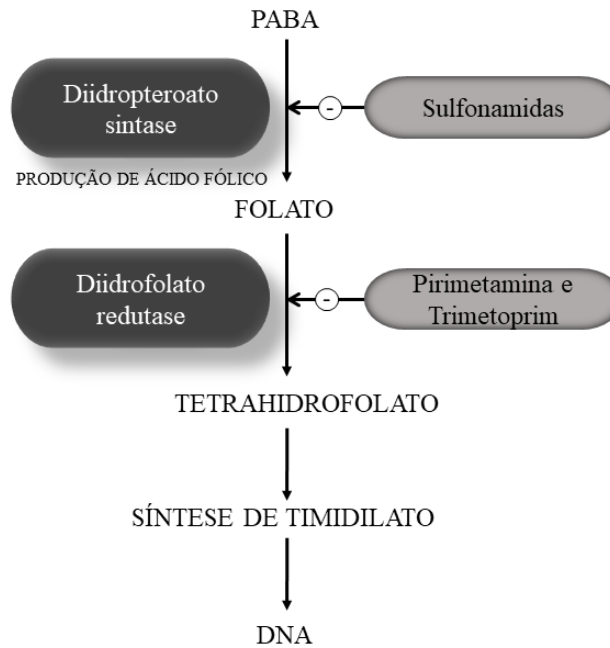
### **1.5. QUIMIOTERAPIA ANTI-TOXOPLASMA**

Apesar de se tratar de uma doença amplamente distribuída no mundo que gera impactos à saúde pública e privada, a toxoplasmose permanece negligenciada e sendo pouco notificada, o que prejudica na elaboração do perfil epidemiológico da doença e na aplicação de estratégias para a prevenção e tratamento (SAMPAIO et al., 2020).

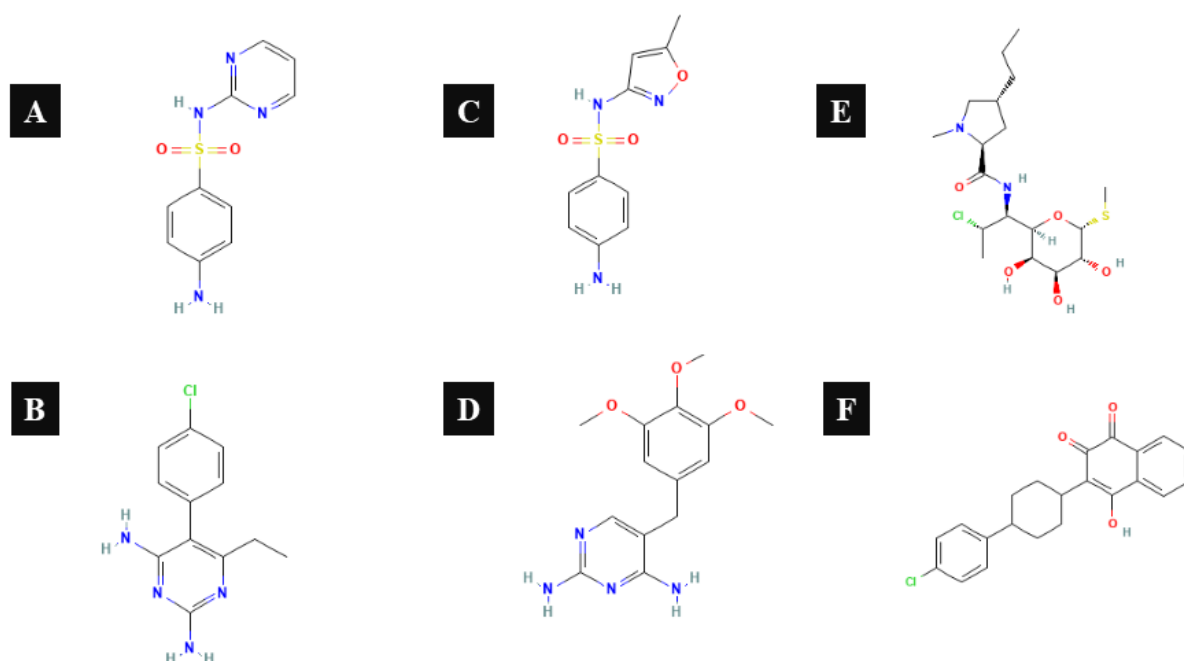
Os fármacos utilizados hoje para o tratamento da toxoplasmose foram, em sua maioria, inicialmente destinados ao tratamento da malária, ocorrendo um reposicionamento de fármacos (ALDAY; DOGGETT, 2017).

A quimioterapia anti-*Toxoplasma* é classificada de acordo com o mecanismo de ação dos fármacos em uso, que podem afetar a síntese de folatos como as sulfonamidas, Sulfadiazina (SDZ) e Sulfametoxazol (SMT), e análogos de pirimidina Pirimetamina (PYR) e Trimetoprim (TMP) que inibem sequencialmente a enzima diidropteroato sintase (DHPS) e diidrofolato redutase (DHFR) (Figura 2); inibidores da síntese proteica associada ao

Apicoplasto como a Clindamicina (CLN) e Espiramicina e inibição da cadeia de transporte dos elétrons das mitocôndrias, agindo sobre o complexo mitocondrial citocromo  $bc_1$  que afeta o estado energético do parasito, como a Atovaquona (ATV) (Figura 3) (COOMBS; MÜLLER, 2002).



**Figura 2:** Via de síntese do folato. As sulfonamidas (SDZ e SMT) possuem efeito sinérgico a PYR e TMP, participando do bloqueio na via de síntese do ácido fólico e folínico. Fonte: Adaptado de Rang et al. (2015).



**Figura 3:** Estrutura química dos fármacos utilizados para o tratamento da toxoplasmose. Na quimioterapia anti-*Toxoplasma* são utilizados seis principais fármacos: Sulfadiazina (A), Pirimetamina (B), Sulfametoxazol (C), Trimetoprim (D), Clindamicina (E) e Atovaquona (F). Fonte: National Center for Biotechnology Information (2023).

Atualmente, o tratamento padrão-ouro consiste na combinação de SDZ e PYR, também podendo utilizar a associação de SMT e TMP, ambos apresentando um efeito sinérgico que afeta a replicação da forma taquizoíta do *T. gondii* (ALDAY; DOGGETT, 2017). A SDZ (2-sulfamilamidopirimidina), análogo estrutural do ácido para-aminobenzóico (PABA), atua de forma antagônica ao PABA, impedindo que o mesmo seja utilizado na síntese de ácido fólico e consequentemente prejudicando a síntese de folatos necessário para a replicação do parasito, mesmo mecanismo de ação utilizado também pelo SMT através da inibição da enzima diidropteroato sintase (BOSCH-DRIESSEN et al., 2002; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; MENECEUR et al., 2008). Os fármacos PYR e TMP afetam a síntese do folato de mesmo modo, inibindo a enzima diidrofolato redutase que prejudica a produção de ácido tetrahidrofolato, que é essencial para a síntese de ácidos nucleicos pelo parasito. Ambos os fármacos atuam no controle da infecção afetando na replicação do *T. gondii* e a PYR é considerada um dos fármacos mais eficazes para o tratamento da toxoplasmose (BOSCH-DRIESSEN et al., 2002; DUNAY et al., 2018).

O tratamento prolongado com PYR de maneira isolada é inviável, uma vez que este causa uma depressão da medula óssea, por isso, é recomendado suplementação de ácido

folínico (Leucovorina) a fim de prevenir ou minimizar os efeitos de toxicidade hematológica. Além disso, outros efeitos adversos podem ocorrer como distúrbios gastrointestinais, hipersensibilidade, mal-estar e febre, também associado ao uso de SDZ, SMT e TMP. Outro ponto a ser discutido é o potencial teratogênico da PYR, sendo assim, não é recomendado o seu uso no primeiro trimestre de gestação (ARAUJO; HUSKINSON; REMINGTON, 1991; DE-LA-TORRE et al., 2011). Nestes casos, o fármaco de escolha é a Espiramicina, relatada por Garin e Eyles (1958), que por se tratar de um medicamento não tóxico e que não atravessa a placenta, tornou-se a primeira escolha a fim de diminuir as chances de transmissão materno-fetal nas primeiras semanas de gestação.

Com relação a hipersensibilidade causada pelo uso das sulfonamidas, estas além de impossibilitar o uso do fármaco no tratamento da toxoplasmose e de outras doenças, pode causar danos severos ao indivíduo, variando desde eritemas cutâneos a reações cutâneas mais graves como síndrome de Stevens-Johnson, necrólise epidérmica tóxica e sintomas mais sistêmicos como anafilaxia (CHOW; KHAN, 2022).

As alternativas para o tratamento da toxoplasmose passaram a ser foco de muitos pesquisadores devido a urgência de encontrar novos fármacos com potencial anti-*Toxoplasma* seguros e eficazes (ZHANG et al., 2019). Devido ao poder inibitório da síntese proteica no apicoplasto pela CLN, a mesma é utilizada clinicamente no tratamento da toxoplasmose. Estudos relatam que a CLN administrada sozinha ou combinada com PYR auxilia na melhora clínica, principalmente entre pacientes com hipersensibilidade à SDZ, permitindo a resolução da retinocoroidite e redução de lesões cerebrais (ARAUJO; REMINGTON, 1974; TABBARA; O'CONNOR, 1980; ROLSTON; HOY, 1987). O apicoplasto, organela plastidial presente em organismos do filo Apicomplexa, é o local de vias metabólicas essenciais para o desenvolvimento do *T. gondii* e por este motivo, é o alvo de diversos fármacos. Em contrapartida, a CLN apresentou-se menos eficaz em casos de reinfecção e taxas semelhantes de toxicidade quando comparada à SDZ (KATLAMA et al., 1996; ALDAY; DOGGETT, 2017).

A ATV foi o último fármaco a ser reposicionado para o tratamento da toxoplasmose, sendo observada com uma potente atividade contra protozoários. Age sobre o complexo mitocondrial citocromo  $bc_1$  inibindo o transporte de elétrons a fim de diminuir o potencial da membrana mitocondrial interna (SCHLITZER, 2007; VAIDYA; MATHER, 2009; VINETZ et al., 2012). Apesar de desempenhar um bom resultado contra as formas taquizoítas e de

forma parcial sob os bradizoítos visualizado em modelo murino (CHORLTON, 2019), sua circulação no Brasil ainda é restrita, o que dificulta sua utilização (ALVES; VITOR, 2005).

Atualmente as terapias disponíveis possuem como alvo a forma taquizoíta do *T. gondii*, agindo apenas na fase aguda da doença. Somado a isto, existem outras problemáticas relacionadas aos efeitos adversos dos fármacos utilizados, falha no tratamento e o potencial de resistência (DE LIMA BESSA; DE ALMEIDA VITOR; DOS SANTOS MARTINS-DUARTE, 2021; MARTINS-DUARTE et al., 2021).

## **1.6. RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA ANTI-TOXOPLASMA**

A resistência a fármacos está associada ao uso indiscriminado e irregular de medicamentos possibilitando uma pressão seletiva de microrganismos resistentes. Erros de prescrição e diagnóstico incerto são algumas das circunstâncias que levam ao uso abusivo de medicamentos e, conseqüentemente, surgimento de resistência (WANNMACHER, 2004).

Existem vários mecanismos de resistência descritos na literatura. A resistência está associada a um crescimento superior do microrganismo que só poderia ser inibido a partir do uso de concentrações maiores que os fármacos conseguem alcançar um sítio de infecção. A resistência pode ser adquirida através da capacidade do microrganismo em inativar a ação biocida de um fármaco, alterar o alvo do antibiótico ou as barreiras de permeabilidade que dificultam a ação do medicamento. Este tipo de resistência é preocupante uma vez que um grupo de microrganismos anteriormente sensíveis a um fármaco tornam-se resistentes a partir de uma pressão seletiva do uso do mesmo, proliferando apenas os organismos resistentes. Além disso, existe a resistência natural na qual os microrganismos são naturalmente resistentes a um grupo de fármacos, diminuindo sua suscetibilidade ao uso dos mesmos. Em consonância com a descoberta de novos medicamentos, novos mecanismos de resistência também estão surgindo, aumentando a morbidade, mortalidade e o impacto financeiro causado por infecções e doenças em todo o mundo (SUSSMANN; MATTOS; RESTREPO, 2002; SCHERER; BOTONI; COSTA-VAL, 2016).

Na década de 70 foi relatado casos de *Plasmodium falciparum*, protozoário causador da Malária, resistentes aos fármacos sulfadoxina e PYR. Foi observado uma possível mutação nos genes associados ao mecanismo de ação dos fármacos, DHFR e DHPS, que decodificam as enzimas que estão envolvidas na via de síntese do folato, implicando em uma diminuição da sensibilidade do parasito aos fármacos, prejudicando o efeito antiproliferativo do fármaco.

Da mesma maneira, foi relatado a resistência a ATV devido a mutação do gene que sintetiza o complexo mitocondrial citocromo bc<sub>1</sub>, também associado ao mecanismo de ação do fármaco. Estes mecanismos de ação também são aplicados contra o *T. gondii* com o uso desses fármacos (VENANZI; LÓPEZ-VÉLEZ, 2016; BISSO-ANDRADE, 2018).

Falhas no tratamento da toxoplasmose devido resistência a medicamentos já foram relatadas na literatura. Existe a hipótese que a alteração nos genes DHPS E DHFR, os mesmos genes envolvidos em casos de resistência de *P. falciparum* aos fármacos utilizados no tratamento da malária, pode ocorrer de forma natural em isolados de *T. gondii*. Dentre os isolados analisados por Aspinall e colaboradores (2002), foi encontrado um isolado proveniente de um caso de toxoplasmose congênita fatal com resistência a SDZ que, com o sequenciamento do gene, foi possível observar uma mutação que daria origem a essa resistência. A mãe da criança não havia sido tratada com sulfonamidas, o que implica na hipótese que seja uma cepa resistente anteriormente a infecção, caracterizando uma resistência natural (ASPINALL et al., 2002).

Meneceur et al. (2008) estudou mutações nos genes DHFR e DHPS de *T. gondii* entre as cepas clonais (I, II e III), encontradas frequentemente na América do Norte e Europa. Neste estudo, 17 cepas foram estudadas a fim de avaliar a suscetibilidade através de ensaios *in vitro* envolvendo o uso de SDZ, PYR e ATV. Algumas cepas apresentaram mutações no gene DHFR, que apesar de ser o gene responsável por codificar a enzima DHFR, enzima alvo da PYR, estas cepas não apresentaram resistência ao fármaco. Além disso, três outras cepas apresentaram resistência ao uso de SDZ. Apesar das mutações apresentadas, é relatado que a suscetibilidade aos fármacos não está relacionada ao genótipo da cepa, tendo em vista que cepas com um mesmo genótipo podem apresentar suscetibilidade diferentes a um mesmo fármaco.

De acordo com De Lima Bessa, De Almeida Vitor e Dos Santos Martins-Duarte (2021), a diversidade genética entre cepas oriundas da América do Sul pode estar associada a uma maior virulência e diferenças no padrão de suscetibilidade ao tratamento. Dados recentes demonstram isolados de *T. gondii* resistente aos antifolatos. Este fato pode estar associado a uma necessidade de um tratamento prolongado, o que contribui para uma falha clínica por falta de assiduidade e permanência no tratamento por parte do paciente e auxilia na seleção de variantes resistentes, além disso o mecanismo de resistência também pode associado à mutação da sequência de genes-alvo (Diidrofolato redutase e diidropteroato sintase) dos fármacos (ASPINALL et al., 2002; PELPHREY et al., 2007).

Cepas atípicas provenientes de casos humanos de toxoplasmose congênita isoladas no Estado de Minas Gerais por Carneiro et al. (2013) foram analisadas por Silva et al. (2017) a fim de avaliar a suscetibilidade aos fármacos SDZ e por Silva et al. (2019) para verificar a suscetibilidade a SDZ e PYR, dentre essas cepas estão TgCTBr4, TgCtBr11, TgCTBr17 e TgCTBr23, sendo a cepa TgCTBr11 a única dentre as quatro cepas atípicas a ser avaliada apenas frente a utilização da SDZ de maneira isolada.

A cepa TgCTBr11 ao ser submetida a ensaios *in vivo* para verificação da suscetibilidade ao uso de SDZ apresentou uma baixa suscetibilidade ao tratamento, com o máximo de 40% de sobrevivência. Esse isolado também foi atestado com um provável perfil de resistência natural quando comparado aos demais isolados estudados por Silva et al. (2017). No entanto, a suscetibilidade da cepa ao uso da PYR não havia sido avaliado anteriormente.

Camundongos infectados pela cepa TgCTBr4 e TgCTBr17, pertencentes ao genótipo (#108), apresentaram uma menor taxa de sobrevivência mesmo quando tratados com concentrações mais altas de SDZ, sugerindo uma diminuição da suscetibilidade frente a utilização do fármaco. Com relação ao uso da PYR, o fármaco apresentou uma baixa eficácia terapêutica em ambas as cepas, porém a associação de SDZ + PYR conseguiu aumentar a sobrevida dos animais quando comparado aos fármacos isolados. Foi identificado ainda a presença de duas mutações nas cepas TgCTBr4 e TgCTBr17. A mutação de aminoácido codificado pela metionina (M) invés da isoleucina (I) e da arginina (R) para histidina (H) pode ser o que garante a diminuição da suscetibilidade com o uso isolado de SDZ (SILVA et al., 2019).

A cepa TgCTBr23, por sua vez, com o aumento das concentrações de SDZ e PYR demonstrou um aumento da sobrevida dos camundongos. No entanto, todos os animais sobreviventes apresentaram a cronificação da doença (SILVA et al., 2019).

Vale salientar a gravidade das infecções por cepas atípicas de *T. gondii*. Um recém-nascido, mesmo utilizando do tratamento associado de SDZ + PYR, infectado pela cepa TgCTBr11 exibiu a forma grave da toxoplasmose congênita, apresentando retinocoroidite ativa, crise convulsiva, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, microftalmia, microcefalia, entre outros. Esta gravidade, além de estar associado com outros fatores, pode estar associada a uma baixa resposta terapêutica ao uso dos fármacos utilizados (SILVA, 2014).

Casos de falha no tratamento de pacientes portadores de HIV fazendo uso de ATV para o tratamento de encefalite também foram descritos devido mutações no complexo mitocondrial citocromo  $bc_1$  e variação fenotípica entre linhagens clonais que conferem resistência à ATV (MCFADDEN et al., 2000; CHIRGWIN et al., 2002; MONTAZERI et al., 2018). A CLN demonstrou-se efetiva no tratamento da toxoplasmose ocular e cerebral. Em contrapartida, estudos recentes demonstram falha no tratamento e caracterização de resistência *in vitro* a este fármaco, embora não haja relatos de cepas naturalmente resistentes (HOSSEINI; ABRISHAMI; MEHDI ZADEH, 2014; MONTAZERI et al., 2018).

O surgimento de cepas resistentes causa preocupação quanto às perspectivas de tratamentos eficientes, aumentando a necessidade de novos estudos em busca de tratamentos alternativos para cepas resistentes e compreensão da suscetibilidade e resistência dos fármacos utilizados atualmente (MONTAZERI et al., 2018).



## 2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é mundialmente difundida e negligenciada em muitos países. O Brasil, por sua vez, possui uma vasta diversidade de cepas atípicas do *T. gondii*. A combinação de SDZ e PYR é o padrão-ouro de tratamento na atualidade, no entanto, outros fármacos foram direcionados para o tratamento da toxoplasmose como o SMT, TMP, ATV e a CLN. Em contrapartida, pouco se sabe sobre a eficácia desses tratamentos em cepas atípicas encontradas no Brasil.

Estudos mais recentes apontam uma suscetibilidade variada entre diferentes cepas frente ao uso de SDZ e PYR, no entanto, ainda não existem relatos sobre a avaliação de suscetibilidade de isolados brasileiros a SMT, TMP, ATV e CLN tanto em ensaios *in vivo* bem como *in vitro*. Além disso, existem cepas que ainda não foram testadas a utilização da associação de SDZ e PYR, como a TgCTBr11.

Deste modo, pesquisas direcionadas a avaliar a variação do perfil de suscetibilidade das cepas aos fármacos são de extrema importância uma vez que a falha no tratamento pode ocasionar um agravamento da doença e, em virtude disso, acarretar na morte de pacientes, principalmente aqueles pertencentes aos grupos de risco para a toxoplasmose. Considerando o impacto da toxoplasmose na sociedade, entender a suscetibilidade ao tratamento e compreender os possíveis mecanismos de resistência de cepas atípicas brasileiras de *T. gondii* tornou-se de extrema urgência.

É provável que a eficácia do tratamento seja variável entre cepas isoladas de recém-nascidos. Portanto, a caracterização dos fármacos utilizados no tratamento da toxoplasmose frente a diferentes cepas atípicas isoladas de humanos, até então pouco estudadas, poderiam auxiliar na validação de novos protocolos de tratamento, tornando-o mais eficientes e diminuindo as chances de complicações mais graves em pacientes suscetíveis.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de suscetibilidade reduzida aos fármacos utilizados para o tratamento da toxoplasmose frente a cepas atípicas de *T. gondii* provenientes de humanos com toxoplasmose congênita isoladas no Estado de Minas Gerais.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de cepas de *T. gondii* obtidas de casos humanos de toxoplasmose congênita tratadas com diferentes concentrações de Sulfadiazina e Pirimetamina, Sulfametoxazol e Trimetoprim, Trimetoprim e Atovaquona;
- Caracterizar a taxa de invasão e proliferação das cepas atípicas TgCTBr4, TgCTBr11, TgCTBr17 e TgCTBr23 *in vitro*;
- Avaliar a suscetibilidade *in vivo* de cepas de *T. gondii* obtidas de casos humanos de toxoplasmose congênita em camundongos Suíços submetidos a diferentes doses de Sulfadiazina e Pirimetamina, Sulfametoxazol, Sulfametoxazol e Trimetoprim, Clindamicina e Atovaquona.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE *T. gondii*

Foram utilizadas quatro cepas atípicas de *T. gondii* provenientes de casos humanos de toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais. O projeto foi cadastrado no SISGEN: A736DE6 (Anexo) e as cepas foram isoladas durante o estudo conduzido por Carneiro et al. (2013). Na Tabela 1 estão as informações adicionais sobre as cepas utilizadas neste estudo.

Os taquizoítos das cepas TgCTBr4, TgCTBr11, TgCTBr17 e TgCTBr23 foram mantidos através de passagens *in vitro* em células *Normal Human Dermal Fibroblast-neo* (NHDF) (Lonza; EUA) cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich; EUA) suplementado com 2 mM de L-glutamina, pool de antibióticos (Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina B) e 2% de soro fetal bovino (GIBCO) e incubados em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para determinar a quantidade de taquizoítos a serem inoculados nos ensaios *in vivo*, foi realizada uma contagem utilizando a Câmara de Neubauer para a obter a concentração de 1x10<sup>4</sup> taquizoítos em 200µl, quantidade a ser inoculada em cada animal. Nos ensaios *in vitro*, a contagem foi realizada conforme a mesma metodologia, considerando a proporção de 10:1 parasitos por célula.

**Tabela 1:** Isolados de cepas de *T. gondii* provenientes de casos humanos de toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais (segundo Carneiro et al., 2013).

Cepas	Localidade	Virulência em camundongos	Genótipo
<b>TgCTBr4<sup>a</sup></b>	Central Mineira	Virulento	#108
<b>TgCTBr11</b>	Região Metropolitana na Belo Horizonte	Virulento	BRII
<b>TgCTBr17</b>	Zona da Mata	Virulento	#108
<b>TgCTBr23</b>	Norte de Minas	Virulento	#41

<sup>a</sup>TgCTBr = Tg = *Toxoplasma gondii*, CT = Toxoplasmose congênita, Br = Brasil

## **4.2. ENSAIOS *IN VIVO***

### **4.2.1. CAMUNDONGOS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Para realização deste estudo, foram utilizados camundongos suíços fêmeas com idade de cinco a seis semanas e peso médio de 23 gramas. Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia ICB-UFMG com o fornecimento de ração e água à vontade, além da manutenção de regime claro/escuro com duração de 12h igualmente.

Foram formados oito grupos, a partir dos fármacos e cepas estudadas, contendo oito animais cada. Os camundongos, previamente distribuídos em grupos de acordo com o fármaco a ser utilizado, foram acompanhados por 42 dias, incluindo os dias de tratamento e dias após a infecção (dpi), para avaliar a possível cronificação da doença e presença de cistos em caso de sobrevivência dos animais até o fim do experimento. Aqueles camundongos que apresentaram perda de peso superior a 20% (PINHEIRO et al., 2015), dificuldades de movimentação e postura encurvada foram submetidos a eutanásia iniciando pela anestesia utilizando Cetamina (100mg/kg) e Xilazina (10mg/kg) seguido por deslocamento cervical, a fim de evitar sofrimento animal. Posteriormente foram submetidos a exames para comprovar a infecção por *T. gondii*. Os camundongos que sobreviveram os 42 dias de acompanhamento também passaram por eutanásia conforme a metodologia descrita previamente.

Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, certificado pelo protocolo 152/2021 (Anexo).

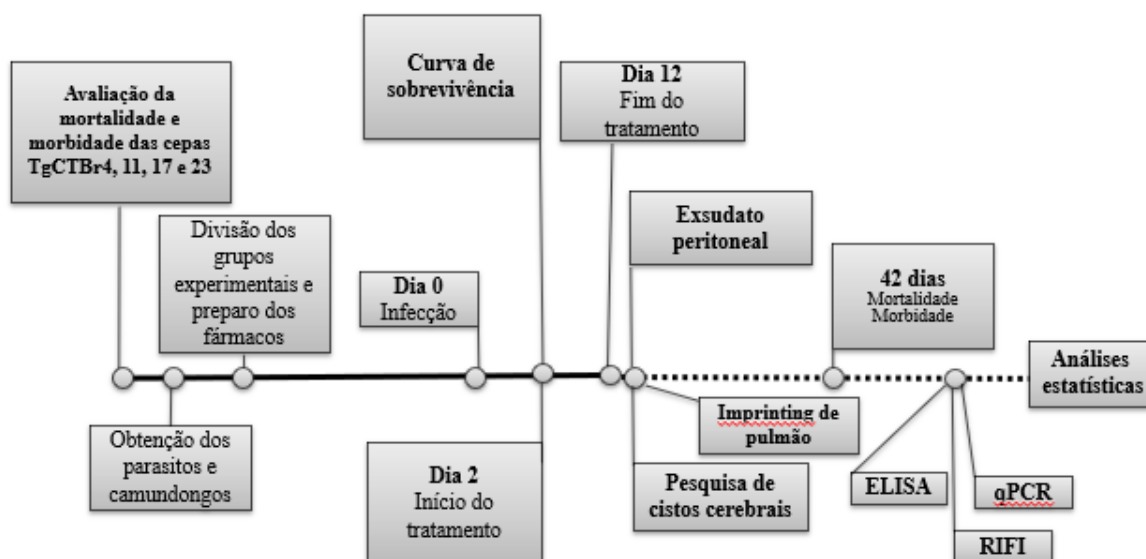
### **4.2.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL *IN VIVO***

Para avaliação da mortalidade e morbidade dos camundongos suíços frente as cepas TgCTBr4, TgCTBr11, TgCTBr17 e TgCTBr17 foi realizada a infecção utilizando 200µl contendo  $1 \times 10^4$  taquizoítos pela via intraperitoneal nos camundongos agrupados no dia 0 do experimento. Após 48h de infecção (infecção aguda), os animais infectados foram tratados por 10 dias consecutivos com a administração dos fármacos por gavagem. Para melhor avaliar a patogenia das cepas estudadas e analisar a possível variação no perfil de suscetibilidade, foram realizados testes conforme descrito na Figura 4.

Os camundongos foram acompanhados por 30 dias após o fim do tratamento. A morbidade e mortalidade foi registrada diariamente a fim de avaliar a curva de sobrevivência

de cada grupo conforme descrito por Martins-Duarte, de Souza, Vommaro (2013). A morbidade foi analisada com o auxílio da pesagem dos camundongos em balança digital portátil semi-analítica no período de dois em dois dias a partir da data da infecção até o término do acompanhamento (42 dias). Durante o acompanhamento, os camundongos eutanasiados passaram por uma lavagem intraperitoneal utilizando 3 mL de PBS a fim de verificar a presença de taquizoítos. Além disso, foi realizada a pesquisa de cistos cerebrais e presença de taquizoítos no *imprinting* de pulmão.

Passados os 30 dias de acompanhamento pós-tratamento, os camundongos sobreviventes foram eutanasiados conforme a mesma metodologia já descrita. Estes, além dos testes citados anteriormente, tiveram sangue coletado para realização de testes de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a confirmação da infecção, além da pesquisa de carga parasitária tecidual de *Toxoplasma gondii* nos cérebros dos camundongos através da PCR quantitativa (qPCR).



**Figura 4:** Delineamento experimental *in vivo* da infecção por cepas atípicas de *T. gondii*. As cepas TgCTBr4, TgCTBr11, TgCTBr17 e TgCTBr17 foram isoladas de casos humanos de toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais.

#### 4.2.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

O tratamento foi iniciado após 48 horas do início da infecção, por via oral, e realizado uma vez ao dia de acordo com os grupos pré-estabelecidos, e teve continuidade por 10 dias.

Os grupos formados foram acompanhados por até 30 dias após o tratamento a fim de avaliar a curva de sobrevivência. A escolha das dosagens a serem administradas seguiu conforme estudos anteriores. Foram formados oito grupos, para cada cepa, sendo um grupo de animais infectados e não tratados e sete grupos de diferentes dosagens e associações de fármacos.

**Grupo Controle:** Animais infectados e tratados apenas com o diluente carboximetilcelulose 0,25%.

**Grupo PYR6,26 + SDZ20:** Animais infectados e tratados com a associação de PYR e SDZ na dose de 6,26 mg/kg/dia e 20 mg/kg/dia respectivamente (SILVA et al., 2019).

**Grupo SMT300:** Animais infectados e tratados com SMT na dose de 300mg/kg/dia (GROSSMAN; REMINGTON, 1979).

**Grupo SMT400:** Animais infectados e tratados com SMT a uma concentração de 400mg/kg/dia (GROSSMAN; REMINGTON, 1979).

**Grupo SMT200 + TMP200:** Animais infectados e tratados com a associação de SMT e TMP a uma concentração de 200 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia respectivamente (GROSSMAN; REMINGTON, 1979).

**Grupo CLN300:** Animais infectados e tratados com CLN a uma concentração de 300 mg/kg/dia (PIKETTY et al., 1990).

**Grupo ATV50:** Animais infectados e tratados com ATV a uma concentração de 50 mg/kg/dia (ARAUJO; HUSKINSON; REMINGTON, 1991).

**Grupo ATV100:** Animais infectados e tratados com ATV a uma concentração de 100 mg/kg/dia (ARAUJO; HUSKINSON; REMINGTON, 1991).

#### 4.2.4. PREPARO DOS FÁRMACOS

Soluções estoque dos fármacos foram preparadas utilizando carboximetilcelulose 0,25% em água destilada. Os fármacos foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich Co, com exceção da CLN 150mg adquirida do laboratório Agener União, divisão veterinária do laboratório União Química Farmacêutica Nacional, lote 2047430 e 2018690.

Após a pesagem dos camundongos, foi realizado o cálculo da média de peso de cada grupo para verificar a quantidade de fármaco necessária para atingir a dose desejada. O

tratamento foi administrado diariamente com 100µl da solução estoque por via oral utilizando agulhas de gavagem animal.

#### **4.2.5. PESQUISA DE CISTOS CEREBRAIS E *IMPRINTING* DE PULMÃO**

O cérebro retirado foi macerado e diluído em 1 mL de PBS pH 7,2 estéril. A partir da suspensão formada e homogeneizada no vórtex, foi preparado duas lamínulas com 10µl cada, seguido de leitura no microscópio de contraste de fase para contagem do número de cistos.

Outro teste utilizado foi o *imprinting* de pulmão, realizando uma incisão na região do mediastino do camundongo para a retirada dos pulmões. Em seguida, foi realizada a retirada do excesso de sangue no papel filtro e feito o *imprinting* em lâminas posteriormente coradas utilizando Panótico Rápido seguido de leitura no microscópio óptico para verificar presença ou ausência de taquizoítos no tecido pulmonar.

#### **4.2.6. EXAME SOROLÓGICO - *ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY* (ELISA)**

O protocolo de ELISA para pesquisa de IgG realizado seguiu o proposto por Brandão et al. (2009). Microplaca de poliestireno com 96 poços com fundo chato (Sarstedt®) foram sensibilizadas overnight (4°C) com 100 µl/poço do antígeno da cepa RH (*soluble tachyzoite antigen - STAg*) diluído a 10 µg/mL em *Coating buffer* (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O destilada). No dia seguinte, a solução do antígeno foi desprezada e a placa lavada duas vezes com solução de lavagem (NaCl, *Tween* 20, H<sub>2</sub>O destilada) e seca por inversão em papel absorvente. Posteriormente, foi realizado o bloqueio utilizando PBS-Caseína 2% por 30 minutos a 37°C e, em seguida, lavagem por duas vezes com a solução de lavagem.

Após a realização da diluição dos soros a 1:100 em PBS-*Tween* 20 a 0,05%/Caseína 0,25%, estes foram adicionados à placa na quantidade de 100 µl/poço, mantendo a placa incubada por 45 minutos a 37°C. Passados o período de incubação, foi adicionado 100 µl/poço do conjugado (anti-IgG de camundongo) (Sigma) marcado com peroxidase e diluído 1:3500 em PBS-T/Caseína 0,25% conforme titulação prévia e o material foi encaminhado para a estufa a 37°C por 45 minutos. Posteriormente, o conteúdo da placa foi desprezado e lavado quatro vezes utilizando a solução de lavagem. 100 µl/poço da solução de substrato, composta por solução de Ácido Cítrico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Ácido Cítrico, H<sub>2</sub>O destilada), 3mg de o-fenilenodiamino (OPD) e 3µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 volumes), foi adicionado à placa em seguida, permanecendo por 20 minutos a 37°C ao escuro.

A reação foi então interrompida utilizando 25µl/poço de ácido sulfúrico 4N e a leitura foi realizada imediatamente no leitor de microplacas BIO-RAD modelo 3550 com filtro de 490 nm, limpando a placa por baixo com papel embebido em álcool antes da leitura. A partir da média da absorbância de seis camundongos soros negativos (controle negativo) mais três desvios-padrão foi calculado o “cut off”. Amostras que obtiverem os valores de absorbância maiores que o *cut off* foram consideradas positivas.

#### **4.2.7. EXAME SOROLÓGICO - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)**

Seguindo o protocolo apresentado por Langoni et al. (2007) e utilizando-se de lâminas com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH previamente fixados e mantidas a -20°C, foi realizada a diluição dos soros em PBS pH 7,2 estéril e adicionada uma gota desta diluição nas marcações da lâmina de RIFI, contendo ainda um controle positivo e negativo. A lâmina foi incubada em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. Em seguida, realizada a lavagem da lâmina utilizando PBS pH 7.2 por 3 minutos, seguida por lavagem com água destilada.

Após a secagem da lâmina e diluição do conjugado em azul de Evans (1:5000), o mesmo foi distribuído uma gota sobre cada orifício do antígeno. A lâmina, então, foi montada com glicerina tamponada pH 7,2 por lamínula e feita a leitura ao microscópio apropriado de fluorescência. Com a observação de fluorescência emitida pelos taquizoítos, foi possível marcar as amostras como positivas. Foram consideradas diluições de 1/16, 1/64 e 1/256 para análise da titulação.

#### **4.2.8. PESQUISA DE CARGA PARASITÁRIA TECIDUAL POR PCR EM TEMPO REAL (qPCR)**

##### **4.2.8.1. Obtenção de DNA de tecido em camundongos suíços infectados com *T. gondii***

Foi realizada a extração de DNA do cérebro utilizando-se do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega®) com modificações no protocolo do produto. Os fragmentos dos tecidos cerebrais que haviam inicialmente sido estocados a -20°C após a coleta foram descongelados em temperatura ambiente e 50 mg foram macerados com o auxílio de um homogeneizador de tecidos para tubos de microcentrífuga modelo Z359971-1EA (Sigma-Aldrich®). Ao tecido previamente macerado, foram adicionados 500 µL da solução de lise nucleica, 100 µL de EDTA 0,5 M e 20 µL de proteinase K (20 mg/mL). Após a



homogeneização suave do material, a suspensão foi mantida em banho-maria a 55°C overnight.

No dia seguinte, foi adicionado à mistura 3 µL de RNase e feita a homogeneização suave por inversão do tubo seguida de incubação de 30 minutos a 37°C. Foi realizada uma pausa por cinco minutos a fim de baixar a temperatura das amostras para temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 200 µL de solução de precipitação de proteínas, homogeneizando as amostras suavemente por inversão. As amostras foram resfriadas em gelo por cinco minutos seguido de centrifugação a 16.000 x g por 5 minutos. Este último passo foi repetido mais uma vez.

O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo e o DNA precipitado com a adição de 600 µL de isopropanol. O precipitado foi centrifugado por 1,5 minutos a 16.000 x g, houve o descarte do sobrenadante e o precipitado foi lavado duas vezes com 600 µL e 200 µL de etanol 70% respectivamente. O tubo contendo o DNA extraído foi mantido em temperatura ambiente por 30 minutos e reidratado com 50 µL de água ultrapura.

Passadas 36h da extração do DNA das amostras, sua concentração foi determinada por espectrofotometria utilizando-se do equipamento NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer. As amostras de DNA foram mantidas a 4°C até o momento da quantificação.

#### **4.2.8.2. Análise da curva padrão de REP-529**

Para avaliar a eficácia dos iniciadores moleculares utilizados para a qPCR, foram feitas as curvas padrão de duas cepas as quais resultaram em camundongos sobreviventes sem a presença de cistos detectáveis por microscopia óptica após o período de tratamento e acompanhamento durante o experimento, TgCTBr11 e TgCTBr23. Para tanto, foram realizados 9 pontos de diluição seriada de 1:10 de DNA a partir de  $3,0 \times 10^7$  taquizoítos na concentração inicial de 90 ng de DNA/µL para cepa TgCTBr11 e 48,490 ng de DNA/µL para cepa TgCTBr23, em triplicata. Os valores de “Cycle Threshold” (CT) foram calculados como a média das duplicatas contra os valores da curva padrão.

As concentrações de DNA dos parasitos foram calculadas conforme Bustin et al. (2009), utilizando a equação de regressão linear ( $y = ax + b$ ), onde  $y = CT$ ;  $a =$  inclinação da curva (slope);  $X =$  número de parasitas; e  $b =$  onde a curva intercepta o eixo  $y$  (intercepção de  $y$ ).

#### 4.2.8.3. PCR em tempo real (qPCR)

A qPCR foi realizada conforme proposto por Camilo et al. (2017) utilizando-se do marcador REP-529 que amplifica uma sequência de 112pb presente no genoma de *T. gondii* de forma repetida (Genbank AF487550).

Para as reações foram utilizados os iniciadores Forward (5'-AGAGACACCGGAATGCGATCT-3') e Reverse (5'-TTCGTCCAAGCCTCCGACT-3') e o kit de GoTaq qPCR Master mix (Promega®). As reações da qPCR foram realizadas no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP) do ICB/UFMG utilizando o termociclador ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) em volume final de 20µL por reação.

As amostras de DNAs controle e da curva padrão com taquizoítos das cepas TgCTBr11 e TgCTBr23 (3 µL para cada ponto) foram adicionados à placa de 96 poços que continha o mix de 17 µL contendo de 10 µL de 2X PCR Master Mix, os iniciadores moleculares (1 µL cada) e água (5 µL) por poço.

As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de 95°C por 2 minutos seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. Os resultados foram expressos como equivalentes de taquizoítos de *T. gondii*/µg de DNA.

#### 4.2.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPadPrism versão 8.4.3 (Prism Software, Irvine, CA, USA). A curva de sobrevivência foi avaliada utilizando o teste de log-rank (Mantel-Cox). O parâmetro de análise não paramétrico para diferenciação do número de cistos de camundongos sobreviventes foram avaliados através do teste de Kruskal-Wallis. A determinação dos testes de qPCR foram avaliados também pelo teste de Kruskal-Wallis a fim de determinar as medianas do número de taquizoítos/µg de DNA entre os animais de cada grupo, seguido pelo teste de Dunn's para identificar as diferenças entre grupos. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

### 4.3. ENSAIOS *IN VITRO*

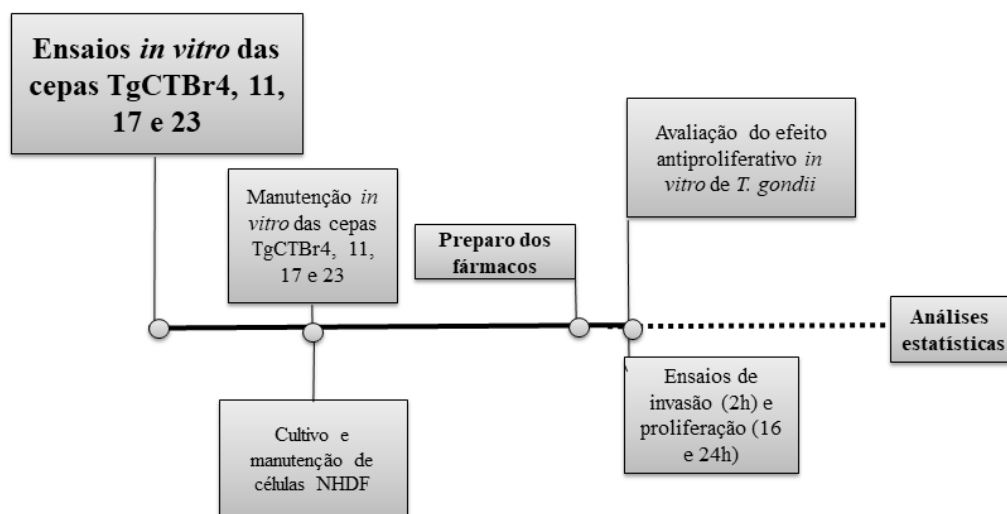
#### 4.3.1. CULTIVO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS NHDF

As células NHDF (Lonza; EUA) foram cultivadas em garrafas próprias para cultura de tecidos de 25cm<sup>2</sup> (Sarstedt) e mantidas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich; EUA) suplementado em estufa úmida a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Com a formação de monocamada íntegra e confluyente, o meio RPMI foi retirado da cultura e as células foram tratadas com 1 mL de tripsina-verseno (Sigma-Aldrich; EUA) a 0,25% e incubadas por 2 minutos para promover o desprendimento das células a 37°C. Após este procedimento, foi acrescentado meio RPMI em quantidade suficiente para repique das células para a garrafa de partida, além de novas garrafas de culturas e placas de 24 poços que foram utilizadas para os experimentos seguintes.

#### 4.3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

Conforme apresentado na Figura 5, a partir do cultivo e manutenção de células NHDF e manutenção *in vitro* das cepas atípicas de *T. gondii*, foi realizado o preparo dos fármacos a serem utilizados nos testes para avaliação do efeito antiproliferativo das cepas frente aos fármacos testados. Estes fármacos foram diluídos em dimetil sulfoxido (DMSO) e armazenados em soluções estoques de diferentes concentrações a fim de serem utilizados durante os experimentos.



**Figura 5:** Delineamento experimental *in vitro* da infecção por cepas atípicas de *T. gondii*. As cepas TgCTBr4, TgCTBr11, TgCTBr17 e TgCTBr17 foram isoladas de casos humanos de toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais.

A partir do preparo dos fármacos, foi iniciado o protocolo de testes para avaliação do efeito antiproliferativo nas quatro cepas estudadas simultaneamente aos ensaios de invasão e proliferação. Ambos ensaios foram desenvolvidos em duplicatas.

### 4.3.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO *IN VITRO* DE *T. gondii*

Para avaliar o efeito antiproliferativo do *T. gondii in vitro*, células NHDF foram cultivadas em lamínulas de vidro em placas de cultura de 24 poços a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram infectadas com taquizoítos recém egressos de culturas de NHDF na proporção 10:1 (parasitos por célula). Para tanto, foi coletado 2 mL de taquizoítos egressos das cepas TgCTBr4, TgCTBr11, TgCTBr17 e TgCTBr23. Após a transferência para tubo do tipo Falcon 15mL, estes foram centrifugados a 1.750 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de parasitos resultante ressuspensionado em 1mL de meio RPMI suplementado.

Para avaliar a quantidade de parasito na amostra, foi feita uma alíquota de 10µL diluída em 490µL de líquido de contagem (Formaldeído 4% em PBS) em tubo de 1,5mL. Para contagem, foi retirado 10 µL dessa solução e adicionada a câmara de Neubauer na qual foi realizada a leitura através do microscópio óptico na objetiva de 40X. Além disso, foi realizada a contagem de células NHDF por poço para calcular a equivalência de parasitos/célula.

Após a infecção das células, foi mantida uma interação parasito-célula por 4 horas. Decorrido o tempo, as células foram lavadas com PBS para a remoção de parasitos extracelulares e acrescentado meio RPMI suplementado, mantendo a infecção *overnight*.

O tratamento foi iniciado após 24 horas da infecção com diferentes concentrações da associação de SDZ 15,6 µM + PYR 0,062 µM; SDZ 31 µM + PYR 0,125 µM; SDZ 62,5 µM + PYR 0,250 µM; SDZ 125 µM + PYR 0,50 µM; SMT+TMP 3,5 µg/mL SMT + 0,7 µg/mL TMP, 7,0 µg/mL SMT + 1,4 µg/mL TMP, 14,0 µg/mL SMT + 2,8 µg/mL TMP, 28,0 µg/mL SMT + 5,6 µg/mL TMP; TMP 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 10,0 µg/mL e 20,0 µg/mL; ATV 0,062 µM, 0,125 µM e 0,250 µM. Como controle, também foram acrescentado poços com células infectadas somente com meio RPMI (sem tratamento).

Passadas 24 horas de tratamento, as lamínulas foram lavadas com PBS estéril, fixadas com Bouin por 10 minutos e lavadas com álcool e água destilada para a remoção do excesso de álcool. Em seguida, foram coradas com os corantes 2 e 3 do kit Panótico Rápido® (Laborclin) por 1 minuto e 10 segundos respectivamente. Após a secagem das lamínulas, estas foram montadas em lâminas de microscopia utilizando Entelan® (Merck). A taxa de proliferação foi avaliada através do microscópio óptico na objetiva de 100X a partir da contagem de 60 vacúolos e quantidade total de taquizoítos, em duas lamínulas diferentes, para cada concentração de fármacos e avaliado conforme o cálculo parasitos totais/quantidade de

vacúolos e normalizados pelo valor do controle = 100%. Ambos ensaios foram realizados em duplicatas independentes.

#### **4.3.4. FÁRMACOS**

Os fármacos foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich Co e reconstituídos em dimetil sulfóxido (DMSO) em concentrações estoque de 1 mM, 5 mM e 200 µM de PYR; 50 mM, 100 mM e 500 mM de SDZ; 2,5 mg/mL, 10 mg/mL e 30 mg/mL de SMT; 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 5,0 mg/mL e 10 mg/mL de TMP; 1 mM e 250 µM de ATV. Antes do uso, as soluções estoques dos fármacos foram diluídas em meio RPMI a fim de obter as concentrações a serem testadas. A concentração de DMSO nos ensaios *in vitro* não excedeu 0,1%.

#### **4.3.5. TESTES DE INVASÃO E PROLIFERAÇÃO EM CEPAS ATÍPICAS DE *T. gondii***

Para os testes de invasão e proliferação de cepas atípicas de *T. gondii in vitro*, as células NHDF foram cultivadas em lamínulas de vidro em placas de cultura de 24 poços a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e as células foram infectadas com taquizoítos recém egressados das quatro cepas estudadas conforme a metodologia já descrita anteriormente, na proporção 10:1 (parasitos por célula). A contagem de células nas placas e dos parasitos na amostra também foram realizadas através da câmara de Neubauer, com diluição prévia em líquido de contagem no fator 50x.

Após a infecção de 6 poços de células referentes ao teste de invasão com duração de 2h, proliferação de 16h e proliferação de 24h, foi mantida uma interação parasito-célula por 2 horas a fim de avaliar a invasão dos parasitos. Decorrido o tempo, as células foram lavadas com PBS para a remoção de parasitos extracelulares e acrescentado meio RPMI suplementado e foi feita a retirada das lamínulas de invasão em capela de fluxo a fim de evitar contaminação dos demais poços da placa. Estas foram fixadas com Bouin por 10 minutos e lavadas com álcool e água destilada para a remoção do excesso de álcool. Em seguida, estas lamínulas foram coradas com os corantes 2 e 3 do kit Panótico Rápido® (Laborclin) por 1 minuto e 10 segundos respectivamente. Foi seguido este mesmo protocolo nas lamínulas de proliferação 16h e 24h. Após a secagem das lamínulas, estas foram montadas em lâminas de microscopia utilizando Entelan® (Merck).

A taxa de invasão foi avaliada através do microscópio óptico na objetiva de 100X a partir da contagem do total de células em cada lamínula, em duplicata, e avaliado conforme o proposto por De Araújo-Jorge e Souza (1984): (parasitos totais X % de células infectadas / células totais). Já os ensaios de proliferação foram avaliados baseando-se no total de vacúolos contados e a porcentagem de vacúolos com respectivas quantidades de taquizoítos (dois, quatro, oito, 16, 32 taquizoítos) (MARTINS-DUARTE et al., 2015). Ambos ensaios foram realizados em duplicatas.

#### **4.3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os dados obtidos nos ensaios *in vitro* foram submetidos e analisados com auxílio do teste One-Way ANOVA. Ambos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPadPrism versão 8.4.3 (Prism Software, Irvine, CA, USA) e as diferenças estatísticas obtidas foram consideradas significativas quando o valor de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS FÁRMACOS *IN VIVO* EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS INFECTADOS COM CEPAS ATÍPICAS DE *T. gondii*

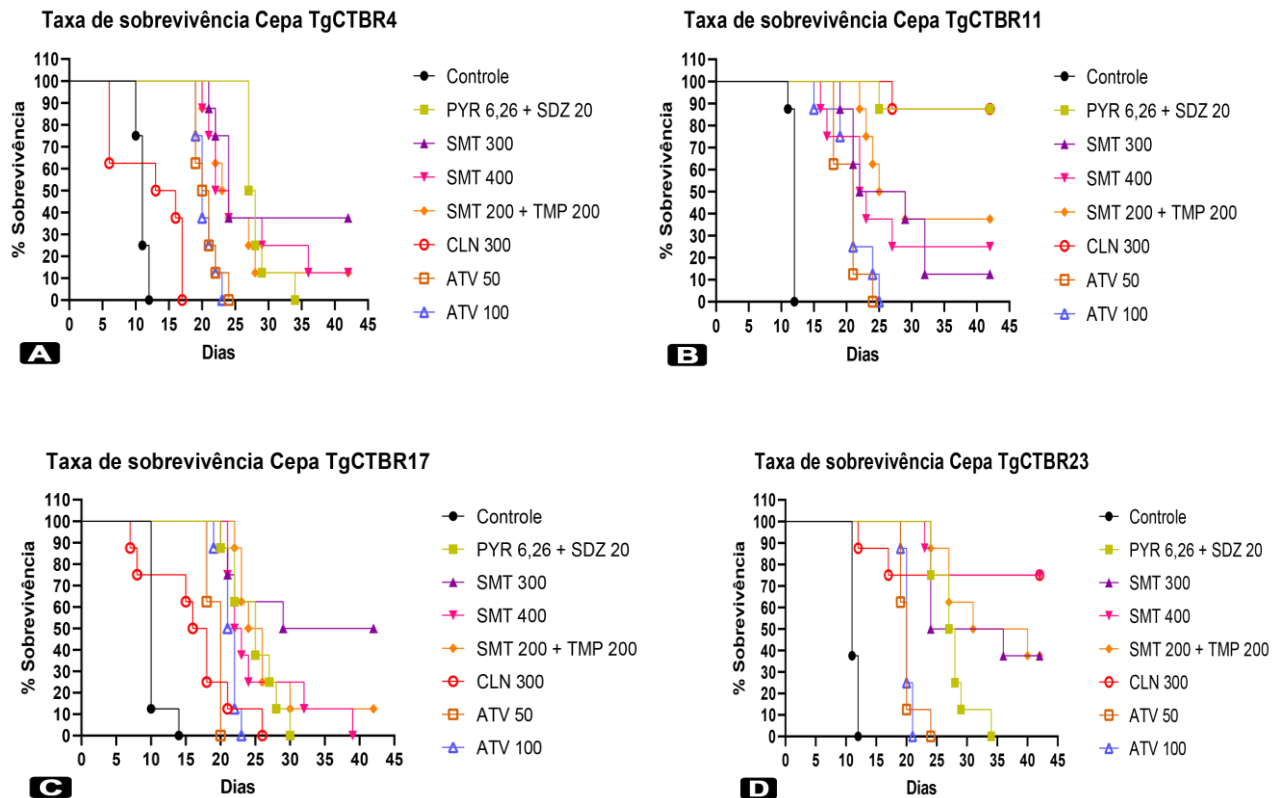
#### 5.1.1. Mortalidade e morbidade em camundongos suíços infectados com taquizoítos de quatro cepas de *T. gondii* e tratados

Foi avaliada a taxa de sobrevivência de camundongos suíços infectados pela via intraperitoneal por cepas atípicas de *T. gondii* (TgCTBr4, TgCTBr11, TgCTBr17 e TgCTBr23) (Figura 6). Todos os camundongos não tratados, independente da cepa estudada apresentaram 100% de mortalidade no período entre o 10° e 15° DPI. Dos grupos de tratamento infectados com a cepa TgCTBr4 (Figura 6A), apenas três grupos tiveram camundongos sobreviventes: SMT 300mg/kg/dia, SMT 400 mg/kg/dia e SMT 200 mg/kg/dia + TMP200 mg/kg/dia, totalizando apenas três camundongos (37,5%), um camundongo (12,5%) e um camundongo (12,5%) sobreviventes respectivamente.

Os grupos de animais infectados com a cepa TgCTBr11, por sua vez, apresentaram uma maior quantidade de camundongos sobreviventes quando comparada a cepa TgCTBr4. Na figura 6B é possível observar quatro grupos com sobreviventes, chamando atenção para o grupo tratado com a associação de PYR e SDZ, atualmente considerado o padrão-ouro para o tratamento da toxoplasmose. Neste grupo, a taxa de sobrevivência atingiu 87,5%, igualmente ao tratamento com a dosagem de 300mg/kg/dia de CLN. Os demais grupos de animais sobreviventes (SMT 300mg/kg/dia, SMT 400mg/kg/dia e a associação de SMT 200 mg/kg/dia + TMP 200mg/kg/dia) tiveram uma taxa de sobrevivência variando entre 10 a 40%.

Os grupos de animais infectados com a cepa TgCTBr17 (Figura 6C) obtiveram uma resposta semelhante à cepa TgCTBr4. O grupo SMT 300mg/kg/dia apresentou quatro animais sobreviventes (50%) e o grupo referente a associação de SMT 200mg/kg/dia + TMP 200mg/kg/dia com uma taxa de sobrevivência em torno de 10%.

Por fim, a cepa TgCTBr23 (Figura 6D) assim como a cepa TgCTBr11, obteve bons resultados de sobrevivência com o tratamento da CLN 300mg/kg/dia (75%), mesma taxa de sobrevivência foi obtida após o tratamento com SMT 400mg/kg/dia. A associação de SMT 200 mg/kg/dia + TMP 200mg/kg/dia bem como o tratamento isolado de 300mg/kg/dia de SMT obtiveram a mesma taxa de sobrevivência dos animais, chegando a 37,5% cada.



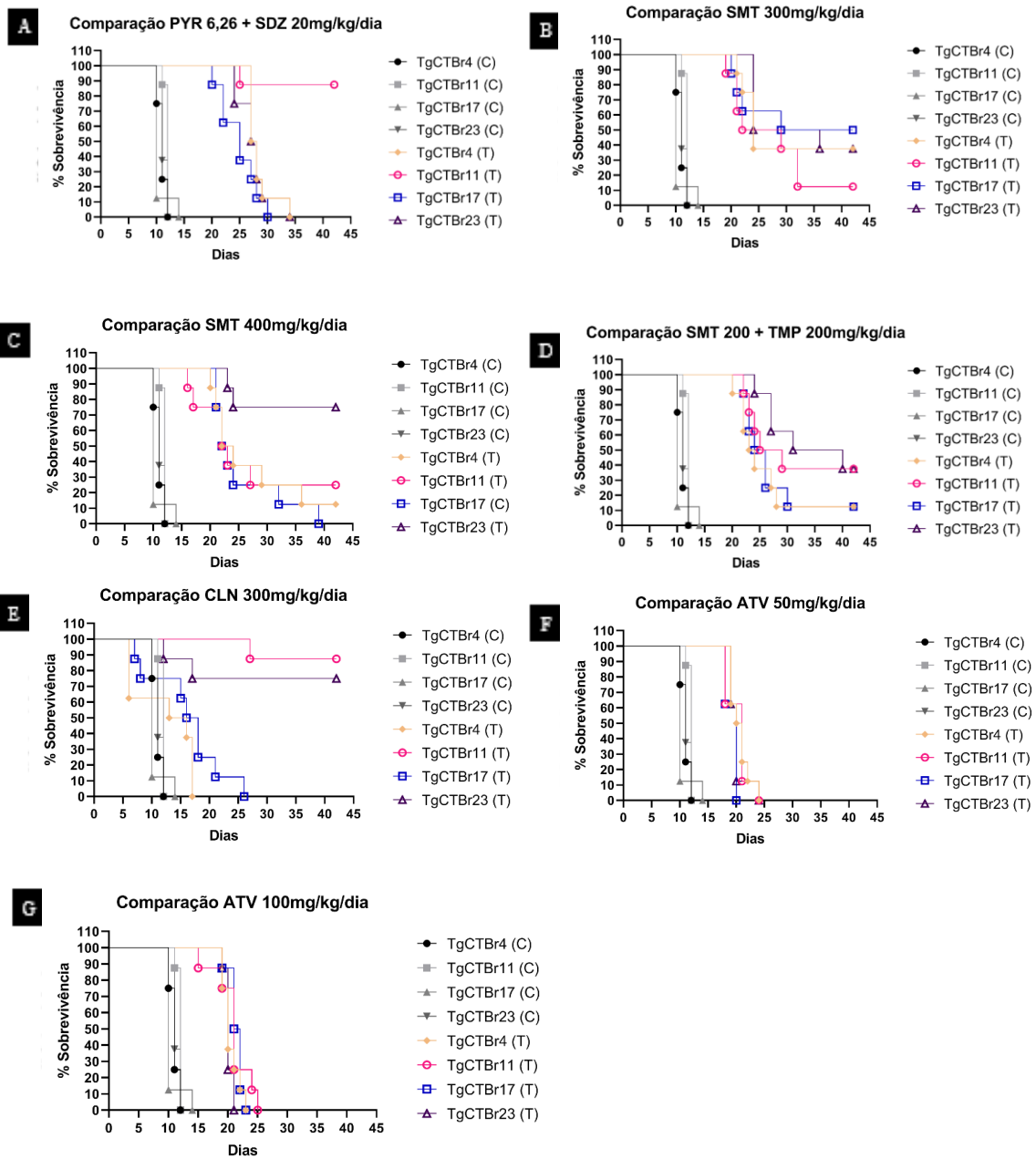
**Figura 6:** Curva de sobrevivência de camundongos suíços inoculados pela via intraperitoneal com  $10^4$  taquizoítos das cepas atípicas de *T. gondii*. As cepas analisadas foram TgCTBr4 (A), TgCTBr11 (B), TgCTBr17 (C) e TgCTBr23 (D). A mortalidade foi observada diariamente durante 42 dias sendo 8 animais/grupo.

Comparando o tratamento entre os fármacos (Figura 7) é possível observar que a associação de PYR + SDZ foi eficiente no tratamento de animais infectados apenas com a cepa TgCTBr11 (Figura 7A). O SMT de forma única ou combinada com TMP auxiliou minimamente no aumento da sobrevida de animais infectados de ambas cepas estudadas (Figura 7B, 7C e 7D).

A CLN auxiliou de maneira eficaz para a sobrevivência daqueles animais submetidos a infecção experimental pelas cepas TgCTBr11 e TgCTBr23, com uma sobrevivência superior a 70% em ambos os grupos (Figura 7E).

Já a ATV, de maneira comparativa, é possível visualizar a falha do tratamento nos animais de ambas as cepas, não sendo observado o efeito positivo do fármaco para o aumento da sobrevida desses animais dentre as duas concentrações estudadas no presente trabalho (Figura 7F e 7G).





**Figura 7:** Comparação da curva de sobrevivência de camundongos suíços inoculados pela via intraperitoneal com  $10^4$  taquizoítos das cepas atípicas de *T. gondii*. As cepas analisadas foram TgCTBr4 (A), TgCTBr11 (B), TgCTBr17 (C) e TgCTBr23 (D) frente cinco fármacos estudados de maneira única ou combinada. A mortalidade foi observada diariamente durante 42 dias sendo 8 animais/grupo.

Foi avaliada ainda a mediana de sobrevivência (dias), que consiste no tempo em que 50% dos camundongos estão vivos (Tabela 2). Dessa forma, foi observada que na cepa TgCTBr4 o grupo CLN300 se assemelha a mediana de sobrevivência do grupo controle, enquanto que na cepa TgCTBr11 os camundongos tiveram uma mediana de sobrevivência indefinida devido a quantidade de animais sobreviventes ser superior a 50%. A cepa TgCTBr17, por sua vez, obteve resultados semelhantes em comparação aos grupos estudados

variando em uma mediana de sobrevivência entre 20 a 25 dias, com exceção do grupo controle (10 dias), SMT300 (35,5) e o grupo CLN300 (17 dias). Com relação a cepa TgCTBr23, alguns grupos apresentaram uma mediana de sobrevivência indefinida, uma vez que mais de 50% dos camundongos sobreviveram. Nesta cepa, a resposta do grupo CLN300 se assemelha ao do mesmo grupo na cepa TgCTBr11.

**Tabela 2:** Mediana de sobrevivência (dias) de camundongos infectados com as cepas TgCTBr4, TgCTBr11, TgCTBr17 e TgCTBr23 tratados por via oral por 10 dias com os diferentes fármacos e acompanhados por 42 dias.

Tratamento	TgCTBr4	TgCTBr11	TgCTBr17	TgCTBr23
NT	11	12	10	11
PYR6,26 + SDZ20	27,5	Indefinido	25	27,5
SMT300	24	25,5	35,5	30
SMT400	23	22	22,5	Indefinido
SMT200 + TMP200	23,5	27	25	35,5
CLN300	14,5	Indefinido	17	Indefinido
ATV50	20,5	21	20	20
ATV100	20	21	21,5	20

Mediana de sobrevivência (dias) = Tempo em 50% dos camundongos estão vivos; Grupos com valores de sobrevivência superior a 50% são classificados Indefinido; NT = não tratado/grupo controle.

### 5.1.2. Presença de taquizoítos no lavado peritoneal e *imprinting* de pulmão de camundongos sobreviventes infectados com cepas atípicas de *T. gondii*

Pesquisas de taquizoítos no lavado peritoneal (exsudato) e *imprinting* de pulmão, foram realizadas apenas naqueles animais sobreviventes ao 42º dia de experimento. Foi observado que na cepa TgCTBr4 (Tabela 3) dentre aqueles grupos com animais sobreviventes apenas um animal do grupo SMT 300 apresentou positividade de presença de taquizoítos no pulmão. Em todos os demais grupos, não foi observado a presença de taquizoítos no pulmão dos animais. Todos os grupos apresentaram negatividade à presença de taquizoítos no exsudato peritoneal.

**Tabela 3:** Presença de taquizoítos no lavado peritoneal e *imprinting* de pulmão de camundongos sobreviventes infectados com a cepa TgCTBr4 após os 42 dias de acompanhamento.

FÁRMACO	TOTAL DE SOBREVIVENTES	LAVADO PERITONEAL (Positivos/negativos)	IMPRINTING DE PULMÃO (Positivos/negativos)
SMT300	3	0/3	1/2
SMT400	1	0/1	0/1
SMT200 + TMP200	1	0/1	0/1

A cepa TgCTBr11 (Tabela 4) apresentou ainda 7 sobreviventes no grupo PYR6,26+SDZ 20, os quais não positivaram para a presença de taquizoítos no pulmão, bem como o grupo CLN300 onde houve a mesma quantidade de camundongos sobreviventes e nenhum deles apresentaram positividade no teste de *imprinting* de pulmão.

**Tabela 4:** Presença de taquizoítos no lavado peritoneal e *imprinting* de pulmão de camundongos sobreviventes infectados com a cepa TgCTBr11 após os 42 dias de acompanhamento.

FÁRMACO	TOTAL DE SOBREVIVENTES	LAVADO PERITONEAL (Positivos/negativos)	IMPRINTING DE PULMÃO (Positivos/negativos)
PYR6,26 + SDZ20	7	0/7	0/7
SMT300	1	0/1	0/1
SMT400	2	0/2	0/2
SMT200 + TMP200	3	0/3	0/3
CLN300	7	0/7	0/7

A cepa TgCTBr17 (Tabela 5) de um modo geral não obteve um número elevado de animais sobreviventes. Entre os animais que sobreviveram até o fim do experimento todos negativaram para a presença de taquizoítos no lavado peritoneal. Da mesma forma, nenhum animal sobrevivente do grupo apresentou a presença de taquizoítos no pulmão.

**Tabela 5:** Presença de taquizoítos no lavado peritoneal e *imprinting* de pulmão de camundongos sobreviventes infectados com a cepa TgCTBr17 após os 42 dias de acompanhamento.

FÁRMACO	TOTAL DE SOBREVIVENTES	LAVADO PERITONEAL (Positivos/negativos)	IMPRINTING DE PULMÃO (Positivos/negativos)
SMT300	4	0/4	0/4
SMT200 + TMP200	1	0/1	0/1

Por fim, a cepa TgCTBr23 (Tabela 6), semelhante a Cepa TgCTBr17, apresentou dados onde os animais sobreviventes não apresentaram positividade no teste do exsudato peritoneal e alguns animais apresentaram a presença de taquizoítos no pulmão, demonstrando a evolução da toxoplasmose aguda.

**Tabela 6:** Presença de taquizoítos no lavado peritoneal e *imprinting* de pulmão de camundongos sobreviventes infectados com a cepa TgCTBr23 após os 42 dias de acompanhamento.

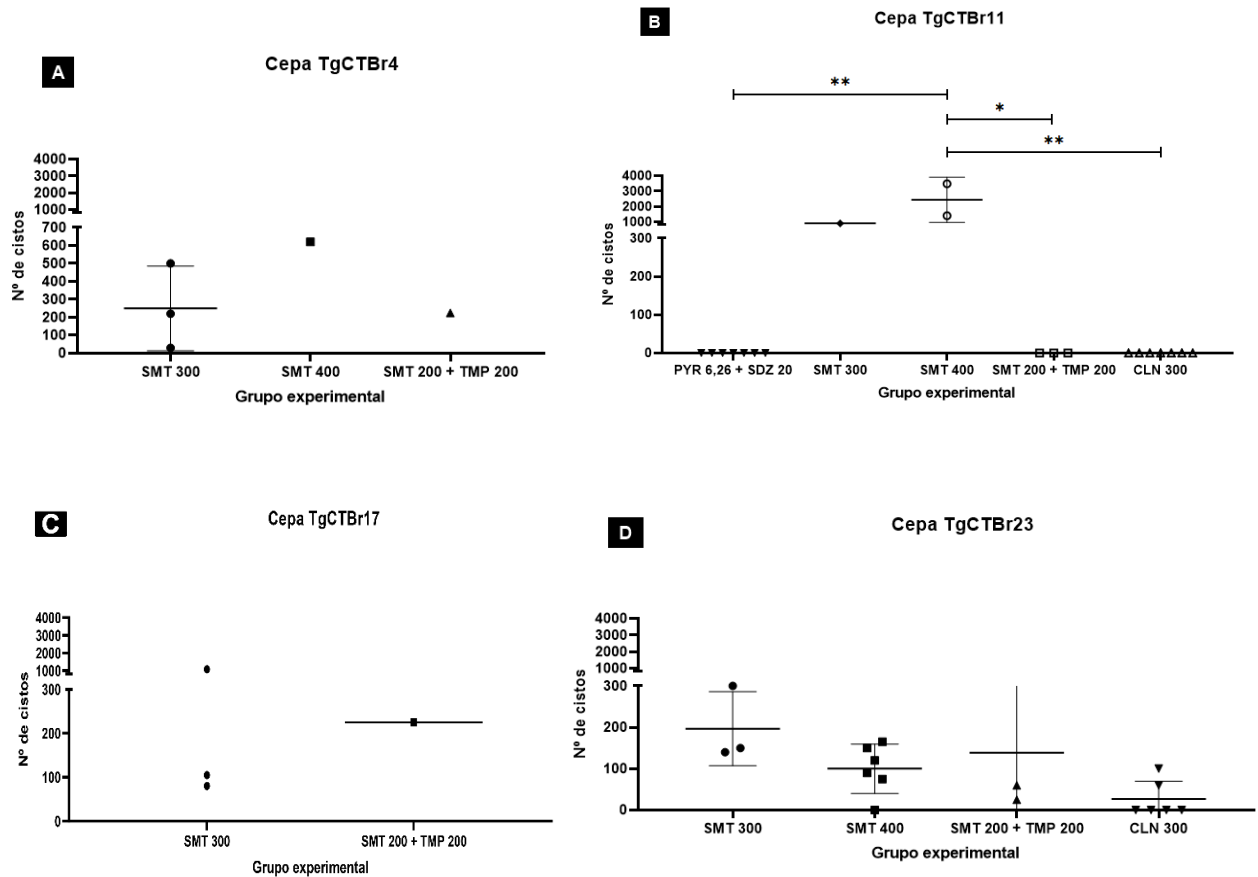
FÁRMACO	TOTAL DE SOBREVIVENTES	LAVADO PERITONEAL (Positivos/negativos)	IMPRINTING DE PULMÃO (Positivos/negativos)
SMT300	3	0/3	0/3
SMT400	6	0/6	0/6
SMT200 + TMP200	3	0/3	0/3
CLN300	6	0/6	4/2

### 5.1.3. Presença de cistos no cérebro de camundongos sobreviventes infectados com cepas atípicas de *T. gondii*

A relação da presença de cistos no cérebro dos animais foi avaliada nos camundongos sobreviventes após os 42 dias de acompanhamento. Os animais infectados com a cepa TgCTBr4 (Figura 8A), apesar de poucos grupos terem apresentado animais sobreviventes, apresentaram a presença de cistos cerebrais. A quantidade de cistos variou entre 200 a 620 cistos por camundongo sobreviventes, com média de 250 cistos no grupo SMT 300 e apenas um sobrevivente nos grupos SMT 400 e SMT 200 + TMP 200, apresentando cada 620 e 225 cistos, respectivamente.

Já a cepa TgCTBr11 (Figura 8B) apesar de mais grupos com animais sobreviventes, a presença de cistos foi apontada apenas em dois grupos contendo de 900 a 3500 cistos por animal, sendo estes com média de 2.440 cistos para o grupo SMT 400 e apenas um sobrevivente do grupo SMT 300 totalizando 900 cistos. Os grupos PYR 6,26 + SDZ20, SMT 200 + TMP 200 e CLN300 não apresentaram cistos durante a contagem. Devido estas diferenças de número de cistos contados no grupo SMT 400, este apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos os quais não apresentaram presença de cistos.

Tanto a cepa TgCTBr17 (Figura 8C) quanto a cepa TgCTBr23 (Figura 8D) apresentaram, em uma maioria, uma média de cistos semelhantes entre si, com exceção do grupo SMT300 da cepa TgCTBr17 que apresentou uma variação superior no número de cistos de 80 a 1000 cistos contados, representando uma média de 447 cistos aproximadamente. O grupo SMT 200 + TMP 200 da mesma cepa contabilizou apenas um sobrevivente com 225 cistos. Já a cepa TgCTBr23 apresentou médias de 197, 100, 375 e 80 nos grupos SMT 300, SMT 400, SMT 200 + TMP 200 e CLN 300, respectivamente.



**Figura 8:** Número de cistos cerebrais nos camundongos sobreviventes. Diferenciação do número de cistos de camundongos sobreviventes das cepas TgCTBr4 (A), TgCTBr11 (B), TgCTBr17 (C) e TgCTBr23 (D). O parâmetro de análise não paramétrica para diferenciar o número de cistos em camundongos sobreviventes foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis e os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ , estando as diferenças estatisticamente significantes entre os grupos indicadas pelo uso do asterisco: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

#### 5.1.4. Pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii* por ELISA e RIFI em camundongos sobreviventes após 42 dias

A fim de comprovar que os animais sobreviventes (42º DPI) positivaram na pesquisa da presença de anticorpos IgG para *T. gondii* foi realizado os métodos sorológicos ELISA e RIFI.

Todos os animais sobreviventes dos grupos infectados com a cepa TgCTBr4 (Tabela 7) quanto as cepas TgCTBr17 (Tabela 9) e TgCTBr23 (Tabela 10) apresentaram sorologia positiva para o *T. gondii* em ambos testes sorológicos.

A cepa TgCTBr11, por sua vez, apresentada na Tabela 8, apresentou divergências quando comparada as demais cepas estudadas. Neste caso, tiveram dois grupos os quais nenhum dos animais sobreviventes apresentaram sorologia positiva para a toxoplasmose: os grupos PYR6,26+SDZ20 e SMT200+TMP200. Além disso, no grupo tratado com CLN300 dos sete sobreviventes, apenas cinco animais apresentaram positividade para a presença de anticorpos no teste ELISA e seis animais no teste RIFI. Apesar do ELISA se tratar de uma técnica com maior sensibilidade, o RIFI apresenta uma maior especificidade (TÁVORA et al., 2007). Dessa forma, é considerado o valor de seis animais com sorologia positiva e apenas um com sorologia negativa neste grupo.

**Tabela 7:** Pesquisa de anticorpos IgG positivo para toxoplasmose através da realização de ELISA e RIFI em camundongos sobreviventes infectados com a cepa TgCTBr4.

FÁRMACO	TOTAL DE SOBREVIVENTES	ELISA (Positivos/negativos)	*RIFI $\geq 1/256$ (Positivos/negativos)
<b>SMT300</b>	3	3/0	3/0
<b>SMT400</b>	1	1/0	1/0
<b>SMT200 + TMP200</b>	1	1/0	1/0

\*Foram consideradas diluições de até 1/256 para análise da titulação para marcar a presença de anticorpo pelo método de RIFI.

**Tabela 8:** Pesquisa de anticorpos IgG positivo para toxoplasmose através da realização de ELISA e RIFI em camundongos sobreviventes infectados com a cepa TgCTBr11.

FÁRMACO	TOTAL DE SOBREVIVENTES	ELISA (Positivos/negativos)	*RIFI $\geq 1/256$ (Positivos/negativos)
<b>PYR6,26 + SDZ20</b>	7	0/7	0/7
<b>SMT300</b>	1	1/0	1/0
<b>SMT400</b>	2	2/0	2/0
<b>SMT200 + TMP200</b>	3	0/3	0/3
<b>CLN300</b>	7	5/2	6/1

\*Foram consideradas diluições de até 1/256 para análise da titulação para marcar a presença de anticorpo pelo método de RIFI.

**Tabela 9:** Pesquisa de anticorpos IgG positivo para toxoplasmose através da realização de ELISA e RIFI em camundongos sobreviventes infectados com a cepa TgCTBr17.

FÁRMACO	TOTAL DE SOBREVIVENTES	ELISA (Positivos/negativos)	*RIFI $\geq$ 1/256 (Positivos/negativos)
SMT300	4	4/0	4/0
SMT200 + TMP200	1	1/0	1/0

\*Foram consideradas diluições de até 1/256 para análise da titulação para marcar a presença de anticorpo pelo método de RIFI.

**Tabela 10:** Pesquisa de anticorpos IgG positivo para toxoplasmose através da realização de ELISA e RIFI em camundongos sobreviventes infectados com a cepa TgCTBr23.

FÁRMACO	TOTAL DE SOBREVIVENTES	ELISA (Positivos/negativos)	*RIFI $\geq$ 1/256 (Positivos/negativos)
SMT300	3	3/0	3/0
SMT400	6	6/0	6/0
SMT200 + TMP200	3	3/0	3/0
CLN300	6	6/0	6/0

\*Foram consideradas diluições de até 1/256 para análise da titulação para marcar a presença de anticorpo pelo método de RIFI.

### 5.1.5. Quantificação da carga parasitária no cérebro dos camundongos sobreviventes infectados pelas cepas atípicas de *T. gondii* TgCTBr11 e TgCTBr23 por qPCR

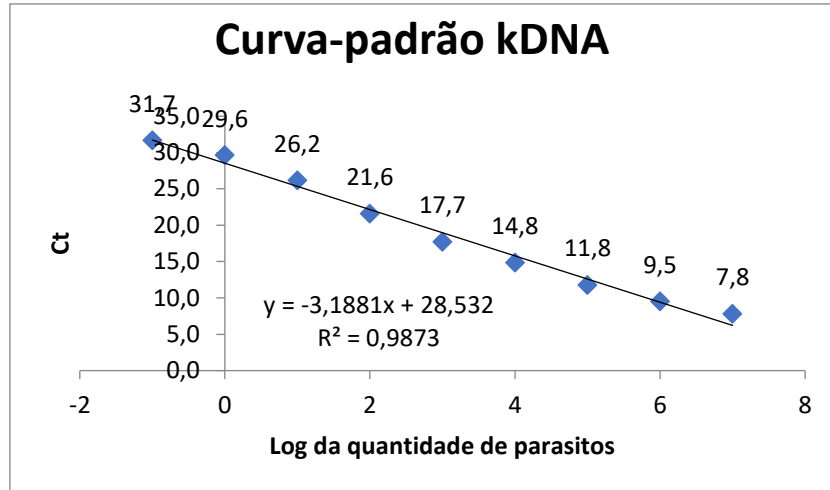
#### 5.1.5.1. Padronização do marcador molecular REP-529 em DNA de taquizoítos de *T. gondii* para Curva padrão

Este ensaio foi realizado somente com os grupos de animais sobreviventes que não apresentaram cistos cerebrais de *T. gondii* na contagem manual através do microscópio óptico. Por este motivo, dentre as cepas estudadas, apenas TgCTBr11 e TgCTBr23 foram utilizadas para a curva padrão e realização da qPCR.

A padronização da curva é importante para avaliar e determinar o limite mínimo de detecção alcançado pelos iniciadores do marcador REP-529 frente o DNA das diferentes cepas analisadas extraído de taquizoítos mantidos em cultura *in vitro* de ambas as cepas. Vale destacar que o DNA não altera com a mudança de estágio evolutivo ou condições de cultivo.

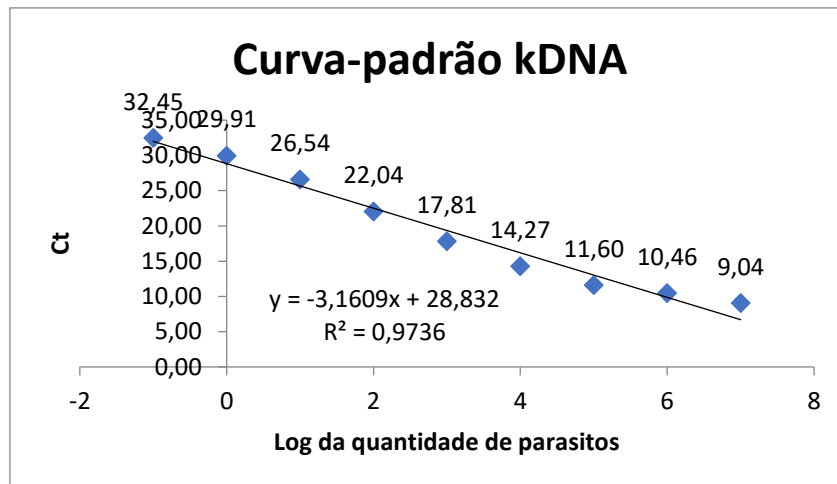


Para a cepa TgCTBr11 (Figura 9) o marcador REP-529 obteve um  $R^2 = 0,9873$ , slope de  $-3,1881$  e uma eficiência de  $107,88\%$  sendo o limite mínimo para detecção do iniciador (em Ct) foi de  $26,2$ , que corresponde a um parasito.



**Figura 9:** Curva padrão de REP-529 para a detecção de DNA de *T. gondii* para a cepa atípica TgCTBr11. Os dados foram baseados conforme a titulação dos 9 pontos de diluição seriada partindo do valor inicial de  $10^7$  taquizoítos (eixo X) e os valores médios das triplicatas de “Cycle Threshold” (Ct) obtido de cada concentração de DNA (eixo Y).

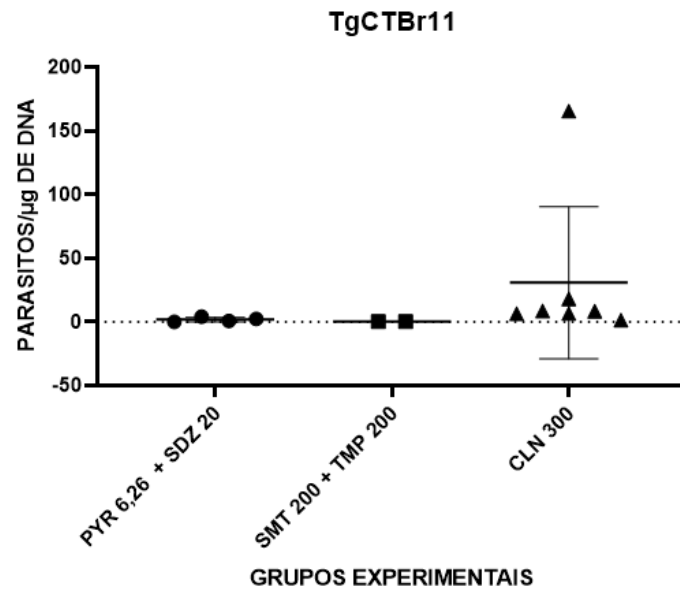
Já a cepa TgCTBr23 (Figura 10) o marcador REP-529 obteve um  $R^2 = 0,9736$ , slope de  $-3,1609$  e uma eficiência de  $108,36\%$  sendo o limite mínimo para detecção do iniciador (em Ct) foi de  $26,54$ , que corresponde a um parasito.



**Figura 10:** Curva padrão de REP-529 para a detecção de DNA de *T. gondii* para a cepa atípica TgCTBr23. Os dados foram baseados conforme a titulação dos 9 pontos de diluição seriada partindo do valor inicial de  $10^7$  taquizoítos (eixo X) e os valores médios das triplicatas de “Cycle Threshold” (Ct) obtido de cada concentração de DNA (eixo Y).

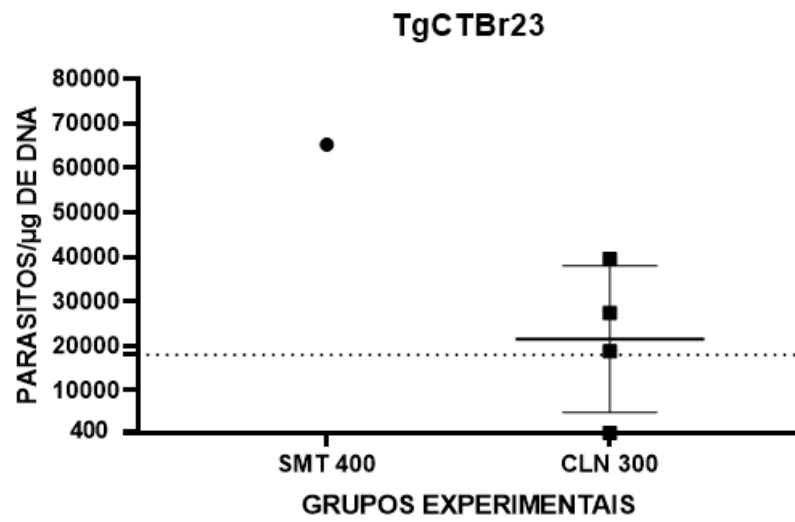
#### 5.1.5.2. Quantificação da carga parasitária em tecido cerebral

A cepa TgCTBr11 apresentou apenas um grupo tratado com a presença de DNA amplificado na qPCR (Figura 11). Animais dos grupos da associação de PYR + SDZ, bem como da associação de SMT + TMP tiveram amplificação semelhantes entre si. No grupo PYR 6,26 + SDZ 20 foi encontrada uma variação de até 0,6 parasitos/ $\mu\text{g}$  de DNA da amostra. Já no grupo SMT 200 + TMP 200, com um valor inferior, em média 0,15 parasitos/ $\mu\text{g}$  de DNA da amostra para cada animal sobrevivente. Assim, nesses dois grupos foram considerados a ausência de parasitos no cérebro, corroborando com os ensaios de pesquisa de cistos pelo microscópio óptico, os quais não apresentaram a presença de cistos e os ensaios sorológicos, nos quais estes grupos não positivaram para anticorpos anti-*Toxoplasma*. Os animais tratados com CLN 300, por sua vez, apesar de não apresentarem cistos na contagem de cistos pelo microscópio óptico, na qPCR foi possível identificar a presença de DNA de *T. gondii* totalizando animais com uma média de 8,24 parasitos/ $\mu\text{g}$  de DNA, em um animal contabilizando uma quantidade mais alta de DNA com 165,3 parasitos/ $\mu\text{g}$  de DNA e um animal sem a presença de amplificação de DNA.



**Figura 11:** Quantificação da carga parasitária por qPCR em tecido cerebral de camundongos infectados com  $10^4$  taquizoítos via intraperitoneal (i.p.) da cepa atípica de *T. gondii* TgCTBr11. Os resultados foram expressos em valores mínimo e máximo para os animais sobreviventes de cada grupo tratado. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Comparando com a cepa TgCTBr11, a cepa TgCTBr23 (Figura 12) apontou uma maior quantidade de parasitos/μg de DNA da amostra entre os dois grupos estudados, sendo o grupo SMT 400 marcado pela maior amplificação de DNA, tem torno de 65.000 parasitos/μg de DNA da amostra e o grupo da CLN 300 com quatro sobreviventes apresentando uma variação de 445 a aproximadamente 40.000 parasitos/μg de DNA da amostra.



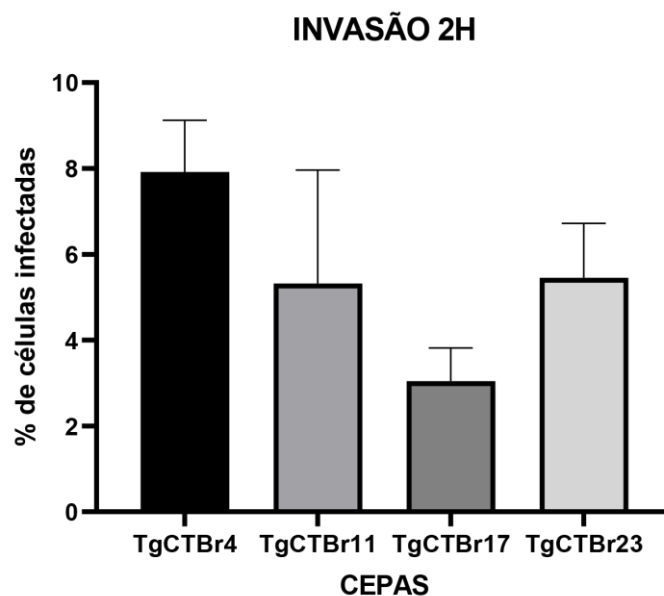
**Figura 12:** Quantificação da carga parasitária por qPCR em tecido cerebral de camundongos infectados com  $10^4$  taquizoítos via intraperitoneal (i.p.) da cepa atípica de *T. gondii* TgCTBr23. Os resultados foram expressos em valores mínimo e máximo para os animais sobreviventes de cada grupo tratado. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

## 5.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS FÁRMACOS *IN VITRO* EM CÉLULAS INFECTADAS COM AS DIFERENTES CEPAS ATÍPICAS DE *T. gondii*

### 5.2.1. Testes de invasão e proliferação de cepas atípicas de *T. gondii*

Devido uma baixa quantidade de estudos a respeito de cepas atípicas de *T. gondii*, as cepas estudadas passaram por testes de caracterização a fim de avaliar as taxas de invasão após 2h e proliferação no período de 16 e 24h.

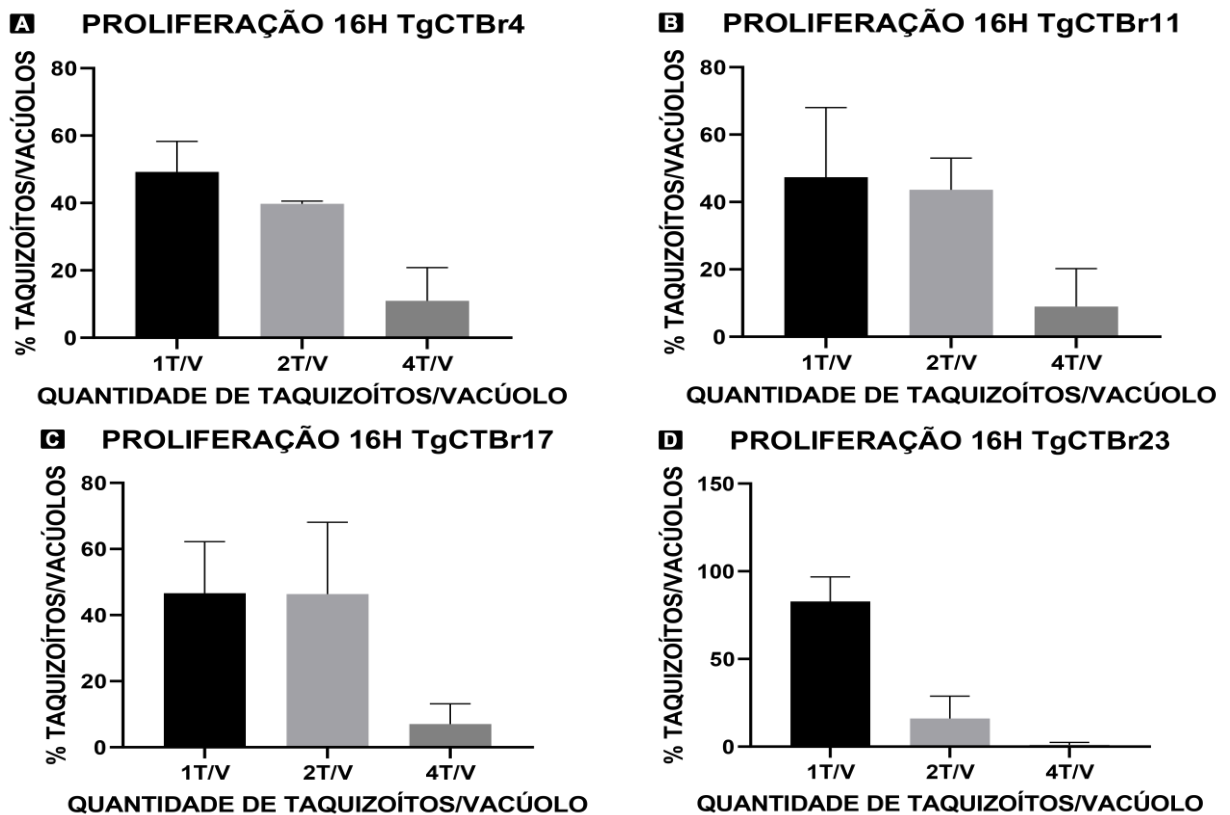
Comparando as quatro cepas estudadas e relacionando-as com as suas respectivas porcentagens de células infectadas, foi observado que a cepa TgCTBr4 apresentou uma maior taxa de invasão quando comparado com as demais cepas. Em média 7,9% das células desafiadas com TgCTBr4 apresentavam infecção após 2h de interação, seguido das cepas TgCTBr11 e TgCTBr23 com média de 5% e a cepa TgCTBr17, com uma menor taxa de invasão com cerca de 3% (Figura 13). Não houveram diferenças estatisticamente significativas entre as quatro cepas estudadas.



**Figura 13:** Taxa de invasão celular de cepas atípicas de *T. gondii* provenientes de isolados humanos de toxoplasmose congênita. Os resultados foram estabelecidos a partir da % de células infectadas no período de 2h para a avaliação da invasão celular pelos parasitos.

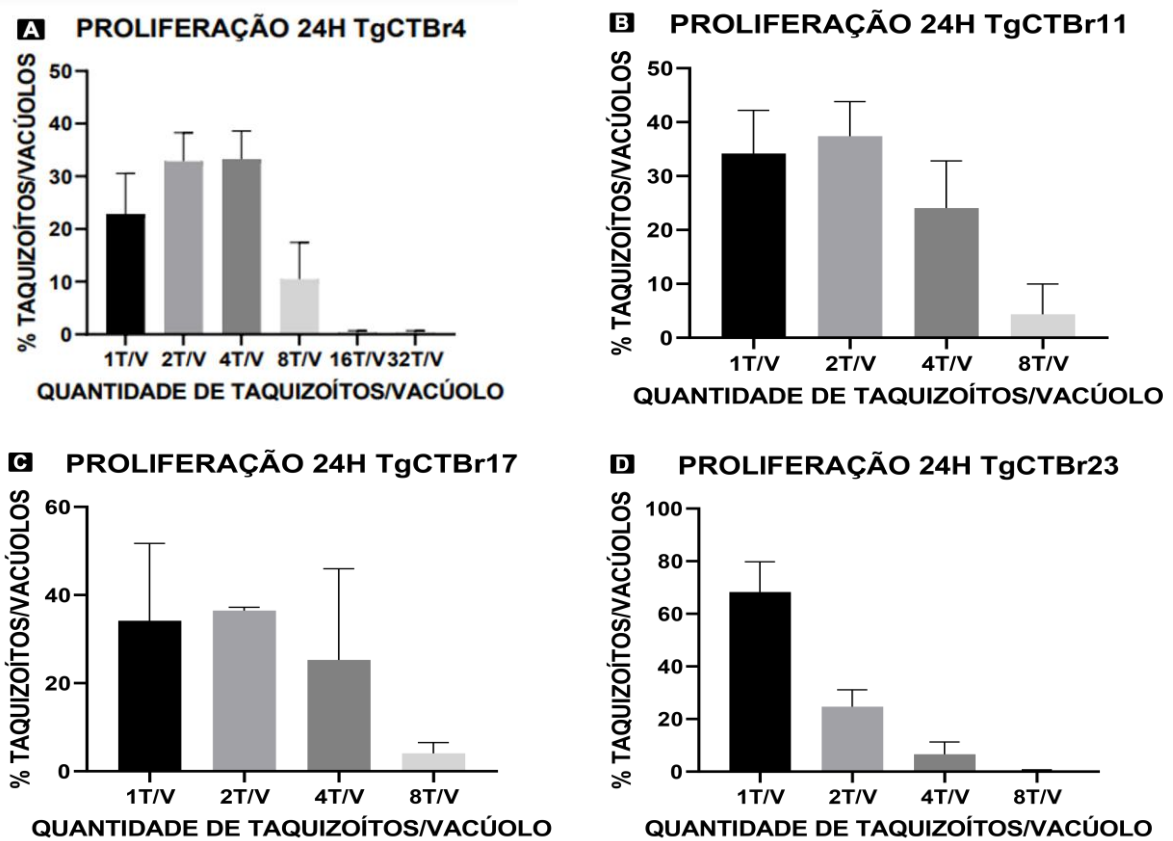
Em relação a proliferação das cepas no período de 16 horas (Figura 14), foi possível observar a presença de vacúolos contendo somente um taquizoíta (40-50%), seguido de dois taquizoítos/vacúolo, em torno de 40%. As cepas TgCTBr4, TgCTBr11 e TgCTBr17 apresentam uma taxa de proliferação semelhantes entre si enquanto que a cepa TgCTBr23

(Figura 14D) prolifera mais lentamente, sendo a única com uma menor taxa de proliferação com a presença de dois taquizitos/vacúolo (16%) ou quatro taquizoítos/vacúolo (1,1%).



**Figura 14:** Proliferação de cepas atípicas de *T. gondii* provenientes de isolados humanos de toxoplasmose congênita no período de 16 horas. Os resultados foram estabelecidos a partir da % de taquizoítos/vacúolo avaliados no período de 16 horas. Onde: T= taquizoítos e V= vacúolos.

A proliferação das cepas no período de 24 horas também ocorre de maneira semelhante entre as cepas TgCTBr11 e TgCTBr17 na qual podemos observar uma redução na % de um taquizoítos por vacúolos e um aumento nas % de dois (35% por cepa) e quatro taquizoítos/vacúolo (25-35% para cada cepa). Também é possível observar o aumento de vacúolos contendo 8 taquizoítos cada (Figura 15). A cepa TgCTBr4 (Figura 15A) foi a única dentre as cepas estudadas que apresentou uma proliferação maior em 24h, apresentando alguns vacúolos contendo 8 (10,4%), 16 (0,2%) e 32 (0,2%) taquizoítos cada. Em consonância a proliferação de 16h, a cepa TgCTBr23 se manteve com uma proliferação mais lenta quando comparada as demais cepas apresentando uma proliferação de 6,6% para 4 taquizoítos/vacúolo e 0,3% para 8 taquizoítos/vacúolo.



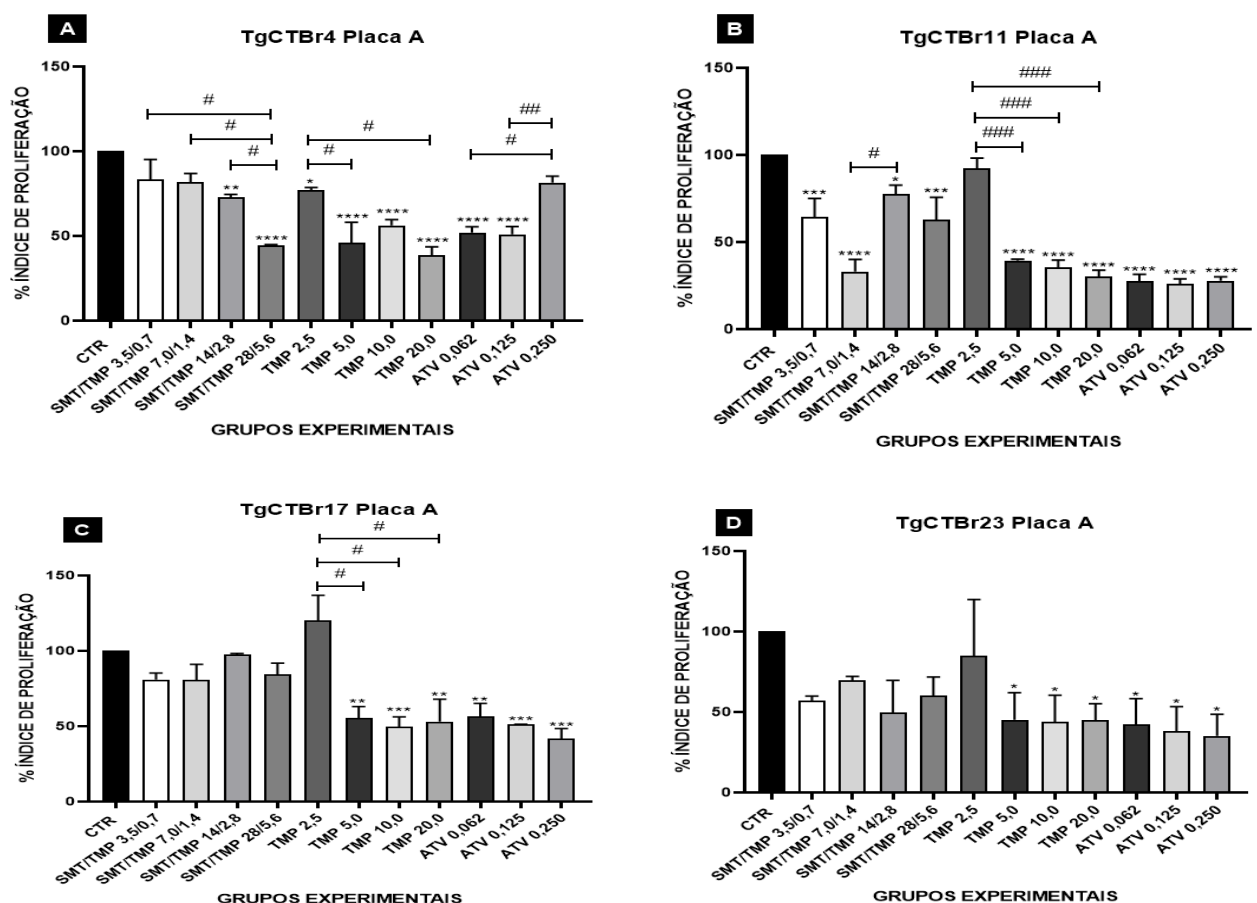
**Figura 15:** Proliferação de cepas atípicas de *T. gondii* provenientes de isolados humanos de toxoplasmose congênita no período de 24 horas. Os resultados foram estabelecidos a partir da % de tachizoítos/vacuólo avaliados no período de 24 horas. Onde: T= tachizoítos e V= vacuólos.

### 5.2.2. Avaliação do efeito antiproliferativo *in vitro* de *T. gondii*

Para uma melhor avaliação do efeito antiproliferativo *in vitro*, os fármacos foram distribuídos por em placas: Placa A com os fármacos alternativos para o tratamento da toxoplasmose; Placa B com a associação da SDZ e PYR.

A cepa TgCTBr4 (Figura 16A) apresentou boas respostas frente ao uso da associação dos fármacos SMT e TMP, ocasionando em uma redução na proliferação destes parasitos para 44,5% na concentração mais alta de SMT 28 + TMP 5,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Esta mesma cepa apresentou um índice de proliferação do *T. gondii* de 56,2% na concentração de Trimetoprim de forma isolada de 10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , no entanto, com o aumento da concentração para 20,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  houve uma redução da proliferação para 38,5%. Curiosamente, a ATV em concentrações mais baixas apresentou um índice de proliferação de até 52%, porém, com o aumento da concentração para 0,250  $\mu\text{M}$  esta proliferação aumentou para 81,45%, sendo observada uma falha na inibição dos parasitos.

Os fármacos TMP e ATV agem de maneira eficaz na cepa TgCTBr11 (Figura 16B) desde as concentrações mais baixas, com uma proliferação inferior a 40% para TMP 5,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 27,6% para ATV 0,062  $\mu\text{M}$ . Em concentrações mais altas, estes fármacos mantêm um padrão com o aumento da inibição dos parasitos. Essa inibição é superior quando comparadas a cepa TgCTBr4 nos mesmos grupos, porém a cepa TgCTBr11 apontou um aumento da % do índice de proliferação quando tratada com a associação de SMT e TMP na concentração de 14 + 2,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (77,6%), apontando uma redução do efeito inibitório dos fármacos, seguido de uma leve redução da proliferação para 62% com o aumento da concentração para 28 + 5,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Figura 16:** Avaliação do efeito antiproliferativo de cepas atípicas de *T. gondii* provenientes de isolados humanos de toxoplasmose congênita frente aos fármacos alternativos utilizados no tratamento da toxoplasmose. Os resultados foram estabelecidos a partir da % do índice de proliferação. As diferenças estatisticamente significativas foram representadas com \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  e \*\*\*\*  $P < 0,0001$  em comparação com o grupo controle (CTR); #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$  comparando com os grupos experimentais de um mesmo fármaco.

A respeito da cepa TgCTBr17 (Figura 16C), esta não apresentou grandes reduções do índice de proliferação dos parasitos mesmo com o aumento das concentrações de tratamento. Essa cepa apresentou uma proliferação superior a 80% quando submetida ao tratamento com a

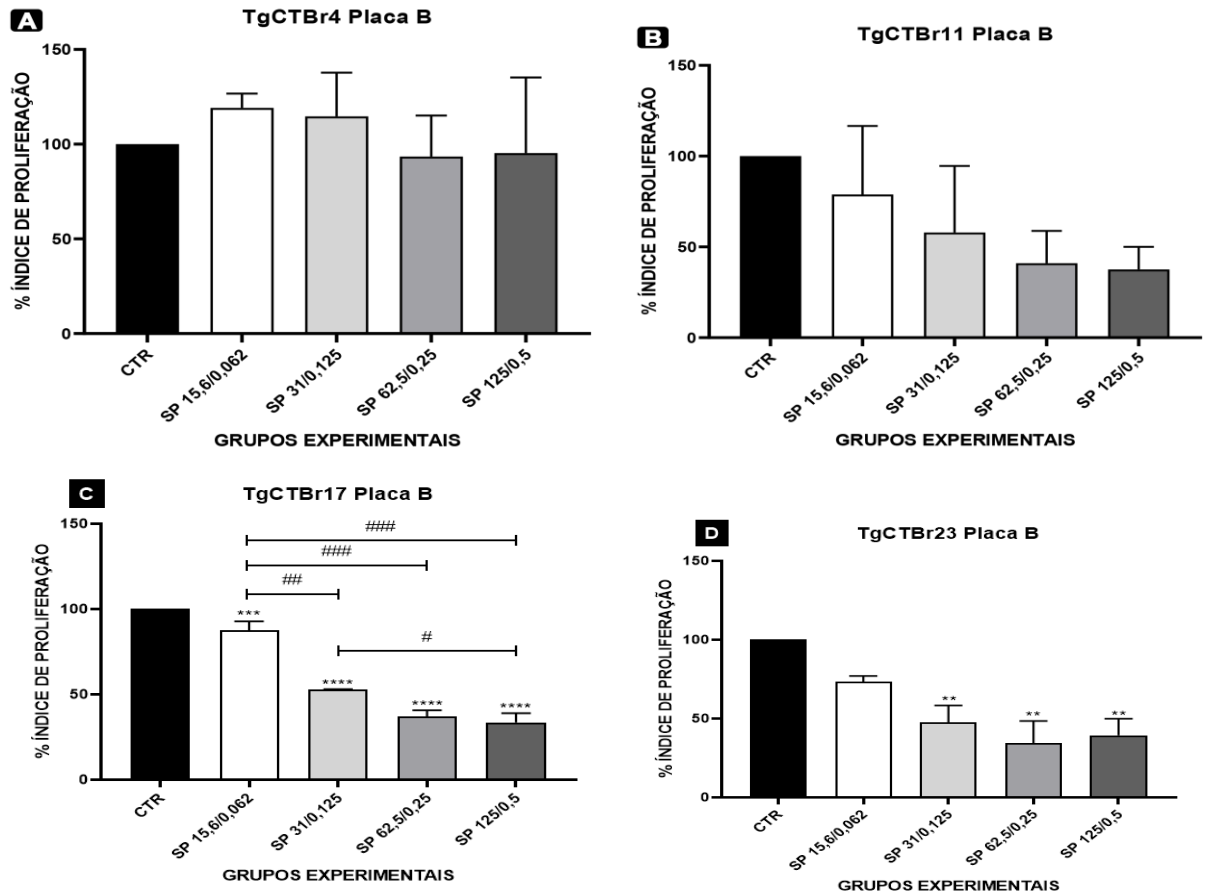


associação de SMT + TMP em concentrações mais altas (28+5,6 $\mu$ g/mL). Com relação ao uso isolado TMP, a cepa apresentou uma diminuição do seu índice de proliferação a partir da concentração 5,0  $\mu$ g/mL, não ultrapassando 53% quando tratada pela dosagem mais alta de 20,0  $\mu$ g/mL. Sobre a ATV, foi observada uma inibição superior com o aumento da concentração para 0,250  $\mu$ M com uma proliferação de apenas 41,7%.

Sobre a cepa TgCTBr23 (Figura 16D) foi possível observar diminuição no poder de inibição do fármaco a partir do aumento da proliferação no grupo tratado por SMT 28 + TMP 5,6  $\mu$ g/mL (60,3%) comparando com uma concentração inferior de SMT 14 + TMP 2,8  $\mu$ g/mL que apresentou uma taxa de proliferação de 49,6%. No entanto, apresentou resultados positivos com uma proliferação inferior a 45% para o uso de TMP na concentração de 20,0  $\mu$ g/mL (44,9%) e ATV 0,250  $\mu$ M (35,1%) de forma isolada.

Com relação ao tratamento padrão-ouro mundialmente estabelecido para a toxoplasmose, a combinação de SDZ e PYR, três das quatro cepas atípicas estudadas apresentaram suscetibilidade ao tratamento. As cepas TgCTBr11, TgCTBr17 e TgCTBr23 apresentaram uma redução no índice de proliferação dos parasitos com o aumento da concentração dos fármacos sendo administrados de maneira combinada, abaixo de 40% de proliferação (Figura 17).

Em contrapartida, a cepa TgCTBr4 (Figura 17A) foi a única cepa a apresentar valores divergentes das demais cepas estudadas. Esta, além do uso da associação dos fármacos SDZ e PYR terem aumentado consideravelmente a proliferação para 95,3% na concentração mais alta dos fármacos (SDZ 125 + PYR 0,5  $\mu$ M), em concentrações mais baixas obtiveram resultados superiores aos valores estabelecidos pelo grupo controle (100%), cerca de 119%.



**Figura 17:** Avaliação do efeito antiproliferativo de cepas atípicas de *T. gondii* provenientes de isolados humanos de toxoplasmose congênita frente aos fármacos SDZ e PYR. Este é o tratamento considerado tratamento padrão-ouro para toxoplasmose. Os resultados foram estabelecidos a partir da % do índice de proliferação. As diferenças estatisticamente significativas foram representadas com \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  e \*\*\*\*  $P < 0,0001$  em comparação com o grupo controle (CTR); #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$  comparando com os grupos experimentais de um mesmo fármaco.

## 6. DISCUSSÃO

Atualmente existe uma escassez a respeito de estudos que priorizem a pesquisa de um esquema terapêutico eficaz para cepas atípicas de *T. gondii* oriundas da América do Sul. Sabe-se que estas são consideradas mais virulentas que as cepas clonais encontradas da América do Norte e Europa, e tendem a desenvolver formas clínicas mais graves. Esta questão pode estar associada a uma diversidade genética, acarretando em variações no padrão de suscetibilidade dessas cepas aos fármacos utilizados no tratamento da toxoplasmose (CARNEIRO et al., 2013; SILVA et al., 2019; DE LIMA BESSA; DE ALMEIDA VITOR; DOS SANTOS MARTINS-DUARTE, 2021).

No Brasil, Silva e colaboradores (2019) observaram uma eficácia variável ao uso de SDZ e PYR no tratamento de cepas atípicas brasileiras de *T. gondii*. Neste estudo, apenas concentrações mais altas dos fármacos, principalmente quando administrados de forma isolada, auxiliaram para aumentar a sobrevivência dos animais incluídos na pesquisa. Khan et al. (1997) demonstraram que a cepa a RH (tipo I) também apresenta baixa resposta ao tratamento com o fármaco SDZ em ensaios *in vivo* utilizando camundongos suíços.

Estudos *in vivo* anteriores de Silva et al. (2017 e 2019) mostraram que as cepas utilizadas na presente dissertação: TgCTBr4, TgCTBr11, TgCTBr17 e TgCTBr23 quando submetidas ao tratamento apresentam-se com uma baixa suscetibilidade ao uso de SDZ, PYR e da associação de SDZ + PYR, sendo a cepa TgCTBr11 a única cepa a ter sido avaliada apenas para o tratamento utilizando SDZ. Nos ensaios também foram avaliadas outras cepas de *T. gondii* que se apresentaram como suscetíveis ao tratamento. Vale salientar que este é atualmente o tratamento padrão-ouro da doença.

No estudo proposto por Silva et al. (2019) foi utilizada a associação de doses baixas de PYR (3,13mg/kg) e SDZ (10mg/kg). A associação dos fármacos apresentou uma eficácia positiva para o tratamento da toxoplasmose experimental dentre as cepas estudadas pelos autores, no entanto, quando comparadas aos fármacos de maneira isoladas nas suas diferentes concentrações, estas mostraram uma baixa eficácia do tratamento.

Neste presente estudo, além de testar a infecção por *T. gondii* de maneira experimental para quatro cepas apresentadas anteriormente com uma suscetibilidade diminuída ao uso de SDZ e PYR, foi utilizado o dobro da concentração utilizada por Silva et al. (2019) frente as mesmas cepas para avaliar a suscetibilidade *in vivo*.

Silva et al. (2017) avaliou apenas a suscetibilidade a SDZ *in vivo* de cepas atípicas de *T. gondii*. Dentre as cepas estudadas, dois isolados (TgCTBr8 e TgCTBr16) foram altamente suscetíveis ao tratamento apresentando uma taxa de sobrevivência superior a 80%. Outros dois isolados demonstraram uma suscetibilidade intermediária (TgCTBr3 e TgCTBr7) com uma sobrevivência variando de 60 a 100%. O isolado TgCTBr11, também estudado no presente trabalho, foi o único a apresentar um perfil fenotípico diferente das demais cepas onde foi demonstrado uma variação na taxa de sobrevivência de 10 a 40% com o aumento da concentração do fármaco, caracterizando um provável perfil de resistência para a cepa.

Em nosso estudo, a cepa TgCTBr11 foi avaliada com o uso da associação de PYR e SDZ em uma dosagem superior ao aplicado em Silva et al. (2019) nas demais cepas. Vale salientar que a TgCTBr11 ainda não havia sido testada frente a associação desses fármacos.

Dentre as quatro cepas estudadas, a TgCTBr11 foi a única cepa que apresentou uma alta taxa de sobrevivência dos animais quando tratadas com a associação de SDZ + PYR (87,5%). Demonstrado por Silva et al. (2017), essa cepa apresentou um perfil de resistência ao uso de SDZ. Dessa forma, é possível que a eficácia do tratamento que auxiliou na sobrevivência dos animais esteja associada ao uso da PYR devido efeito sinérgico entre os fármacos.

Em casos de hipersensibilidade e descontinuação do uso do SDZ, a PYR pode ser utilizada sozinha ou de forma combinada com outros fármacos como a CLN. A CLN administrada sozinha ou combinada com PYR auxilia na melhora clínica dos pacientes e vem sendo utilizada principalmente entre pacientes com hipersensibilidade à SDZ. Além disso, seu efeito é positivo na resolução da retinocoroidite e redução de lesões cerebrais, sendo um tratamento viável (TABBARA; O'CONNOR, 1980; ROLSTON; HOY, 1987; ARAUJO; REMINGTON, 1974).

Em contrapartida, no presente estudo, entre as cepas estudadas, o tratamento utilizando CLN só foi eficaz entre as cepas TgCTBr11 (87,5%) e TgCTBr23 (75%). Este ponto pode se tornar preocupante justamente devido a CLN ser uma primeira escolha de utilização com a inviabilidade do tratamento com SDZ, principalmente pelos bons resultados para o tratamento da toxoplasmose ocular, sendo este o tipo de toxoplasmose mais frequentemente relatado dentre as cepas atípicas brasileiras.

Já existem relatos mais recentes que demonstraram falha no tratamento e caracterização de resistência *in vitro* induzida CLN em cepas clonais, embora ainda não haja relatos de cepas naturalmente resistentes (HOSSEINI; ABRISHAMI; MEHDI ZADEH, 2014;

MONTAZERI et al., 2018), sendo este presente estudo o primeiro trabalho a demonstrar a possível existência de cepas de *T. gondii* naturalmente resistentes a CLN.

O uso de SMT isoladamente na concentração de 300mg/kg e 400mg/kg ou associado ao TMP (SMT 200mg/kg + TMP 200mg/kg) em nosso estudo também aumentaram a sobrevivência dos animais, mesmo que não intensivamente, entre as cepas estudadas. Sabe-se que estes fármacos possuem o mesmo mecanismo de ação que a SDZ e PYR (COOMBS; MÜLLER, 2002), então podem ser utilizados alternativamente quando as cepas não respondem ao uso da associação de SDZ e PYR.

O uso de SMT e TMP para tratamentos de protozoários já foi relatado, como na malária, em ensaios *in vivo*. Kanya et al. (2007) demonstra que o uso de SMT e TMP está associado a uma diminuição na morbidade e mortalidade e é recomendado o seu uso como forma de profilaxia para pacientes soropositivos para HIV tendo em vista que diminui o risco de infecção e evolução da malária nestes pacientes. Thera et al. (2005) também abordou o uso de SMT e TMP para o tratamento de malária, apontando uma eficácia protetora de 99,5% com o uso profilático dos fármacos e eficácia de 97% no uso para o controle da infecção.

Vale salientar que este tratamento pode ser inviável em alguns casos, uma vez que existem relatos de falha terapêutica devido resistência de *P. falciparum* aos antifolatos devido mutações nos genes que codificam as enzimas alvos dos fármacos (VENANZI; LÓPEZ-VÉLEZ, 2016; BISSO-ANDRADE, 2018). A existência de mutações em outros protozoários que afetam o mecanismo de ação dos antifolatos é preocupante também na toxoplasmose, por se tratarem de fármacos que também são de primeira escolha no tratamento da doença.

Grossman e colaboradores (1979) demonstraram através de ensaios *in vivo* que os fármacos SMT e TMP combinados agem de forma sinérgica e são eficazes em infecções por cepas clonais de *T. gondii*.

Com relação ao presente estudo utilizando cepas brasileiras atípicas, o SMT de forma isolada ou associada ao TMP auxiliou minimamente na melhora dos animais infectados pelas quatro cepas de *T. gondii* estudadas onde a taxa de sobrevivência não foi superior a 40%, caracterizando uma baixa suscetibilidade ao tratamento. Em contrapartida, o fármaco se comportou como um bom tratamento na concentração de SMT 400mg/kg/dia para a cepa TgCTBr23 com apresentando 75% de sobrevivência entre os animais tratados.

Sabe-se que a ATV é o único fármaco que além de desempenhar um bom resultado contra as formas taquizoítas, atua de forma parcial sob os bradizoítos (CHORLTON, 2019). Esse fármaco tem sido utilizado principalmente em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) com toxoplasmose, em especial a toxoplasmose ocular e neurotoxoplasmose, que apresentam hipersensibilidade as sulfonamidas ou PYR (DUBEY; CRUTCHLEY, 2008). Mesmo sendo um excelente fármaco de escolha, dentre as quatro cepas estudadas, nenhuma apresentou bons resultados *in vivo* frente ao uso deste fármaco para tratar a toxoplasmose em camundongos infectados, mesmo em uma concentração mais alta.

Todas as cepas apresentaram laudo negativo para a presença de taquizoítos no lavado peritoneal ao fim do experimento (42 dias). Sabe-se que com a evolução da fase aguda da doença, os parasitos são mais encontrados frequentemente nos pulmões e os cistos inicia sua formação a partir do 10º dia, dando início ao processo de encistamento e encaminhando para fase crônica da doença (COHEN et al., 1976; SEVÁ et al., 2006). Dessa maneira, é esperado que alguns camundongos apresentem apenas taquizoítos no pulmão e presença de cistos no cérebro.

A cepa TgCTBr11 apresentou-se de maneira onde dois grupos (PYR 6,26 + SDZ 20 e SMT 200 + TMP 200) além de sobreviverem ao final do experimento (42 dias), não apresentaram presença de cisto, IgG e taquizoítos no pulmão. Esses animais também foram submetidos a qPCR para confirmar a ausência de DNA de *T. gondii* no cérebro e como resultado, foi observado que os mesmos não amplificaram DNA de *T. gondii*, sugerindo a eficácia do tratamento e cura dos animais.

Apesar dos relatos de diminuição de suscetibilidade ao uso de SDZ e PYR descritos na literatura para cepas atípicas de *T. gondii* brasileiras (SILVA et al., 2017, SILVA et al., 2019), estes ensaios foram aplicados apenas em testes animais. Aqui, além de descrevermos o comportamento de quatro cepas atípicas de *T. gondii* no modelo *in vivo*, também foi analisado o desempenho dos fármacos em modelo *in vitro*.

A partir dos testes de invasão e proliferação de 16h e 24h foi possível observar uma semelhança entre as cepas estudadas. Ambas apresentaram uma média de invasão semelhantes e sem diferenças estatisticamente significativas no período de 2h, variando entre 3-7,9%. Sendo a de menor taxa de invasão correspondida pela cepa TgCTBr17 (3%) e maior invasão TgCTBr4 (7,9%). As cepas TgCTBr11 e TgCTBr23 apresentaram a mesma porcentagem de invasão com 5%.

Conforme a proliferação de 16h e 24h as cepas TgCTBr11 e TgCTBr17 foram mantendo um mesmo padrão, sendo encontrados vacúolos com maior quantidade de taquizoítos apenas na cepa TgCTBr4 e uma proliferação mais lenta na cepa TgCTBr23. Sabe-se que o processo de invasão e proliferação no ciclo do *T. gondii* pode influenciar na capacidade infecciosa da cepa e na diferença dos padrões de suscetibilidade (BLACK; BOOTHROYD, 2000; BLADER et al., 2015). Dessa forma, a compreensão desse comportamento diferenciado entre as cepas permitiu uma melhor caracterização e investigação da eficácia e comportamento do tratamento aplicado em cada grupo a partir das suas características semelhantes.

Com isso, foram analisados os comportamentos das quatro cepas frente aos ensaios antiproliferativos utilizando-se dos mesmos fármacos analisados nos ensaios *in vivo*, com exceção da CLN.

Contrariando o observado nos ensaios *in vivo* em que a associação de SMT 200mg/kg + TMP 200mg/kg não foi um tratamento tão eficiente, nos ensaios *in vitro* com a cepa TgCTBr4 foi observada uma boa redução no índice de proliferação e suscetibilidade ao tratamento com a associação dos fármacos SMT e TMP na concentração de SMT 28 + TMP 5,6 µg/mL relatando apenas 44,5% de proliferação. O uso de TMP isoladamente na concentração de 20,0 µg/mL também foi positivo, apontando 38,5% de proliferação. Ambos os tratamentos contribuíram com a diminuição da proliferação do *T. gondii*. O uso da ATV de maneira isolada não foi positivo nesta cepa, chegando a um índice de proliferação superior a 80% na concentração mais alta estudada (0,250 µM).

Curiosamente e da mesma maneira que apontado nos ensaios *in vivo*, o tratamento com a associação de PYR e SDZ apresentou uma baixa eficácia frente a infecção com a cepa TgCTBr4 nos ensaios *in vitro*. Neste estudo foi possível observar que em concentrações mais baixas desses fármacos a proliferação do parasito chegou a ser superior àquela exibida pelo grupo controle (não tratado) atingindo um índice de proliferação de 119%. Ainda que com o aumento da concentração de ambos os fármacos, essa proliferação se manteve alta, cerca de 95% na concentração de SDZ 125 + PYR 0,5 µM. Dessa forma, é observado que o tratamento considerado hoje o padrão-ouro no tratamento da toxoplasmose, nos ensaios *in vitro*, não seria viável frente esta cepa devido alta característica de diminuição da suscetibilidade.

Células infectadas pela cepa TgCTBr11, por sua vez, diferentemente da cepa TgCTBr4, não apresentaram boas respostas ao tratamento associado de SMT e TMP,

apresentado 62,7% de proliferação do parasito mesmo utilizando uma concentração de SMT 28 + TMP 5,6 µg/mL no ensaio. Nos ensaios *in vivo* esta cepa também havia caracterizado uma baixa suscetibilidade ao tratamento utilizando a associação desses fármacos. No entanto, os animais sobreviventes (37,5%) não apresentaram cronificação e anticorpos IgG positivos para *T. gondii*.

Interessantemente foi observado nos ensaios *in vitro* que a resposta da cepa TgCTBr11 ao tratamento isolado de TMP em sua concentração mais alta de 20,0 µg/mL diminuiu a proliferação do parasito em cerca de 62% quando comparada a menor concentração estudada (2,5 µg/mL). Dessa maneira pode-se associar o bom resultado com a não cronificação da doença apesar de uma taxa de sobrevida baixa nos ensaios *in vivo* provavelmente pela utilização do TMP associado ao SMT.

A ATV também auxiliou em uma diminuição do índice de proliferação dos parasitos para cerca de 27,7% na cepa TgCTBr11 em sua concentração de 0,250 µM, sendo esse um excelente resultado dentre os ensaios *in vitro* para essa cepa.

A cepa TgCTBr11, que havia sido a única cepa com bons resultados na sobrevida dos animais com a utilização da associação de SDZ e PYR, manteve os resultados nos *ensaios in vitro*. Neste, a proliferação não ultrapassou 38% na concentração de SDZ 125 + PYR 0,5 µM, caracterizando a associação dos fármacos como uma excelente escolha para o tratamento da toxoplasmose.

Correlacionando os ensaios *in vivo* e *in vitro*, foi possível observar um comportamento semelhante entre as cepas a respeito dos fármacos SMT e TMP, nas quais não foram benéficas para o tratamento da infecção experimental por *T. gondii*, com exceção da cepa TgCTBr4 na qual houve uma diminuição da proliferação com a associação dos fármacos.

Em contrapartida, para todas as cepas, não havia sido demonstrado uma boa eficácia ao tratamento com ATV nos ensaios *in vivo*, mas apresentaram boas respostas com a diminuição do índice de proliferação nos ensaios *in vitro*. A cepa TgCTBr4 também foi uma exceção, sendo a única a não responder ao tratamento utilizando ATV de maneira eficaz. Essa diferenciação pode estar associada a diversos fatores como a biologia do parasito, mutações ou superexpressão de proteínas. Dessa forma, pode haver a necessidade do aumento da concentração nos ensaios *in vivo* para verificar uma possível melhora no quadro dos animais para melhor compará-lo aos resultados positivos do ensaio *in vitro*.



A cepa TgCTBr11 anteriormente havia sido a única com melhora no quadro animal ao uso da associação de SDZ e PYR nos ensaios *in vivo*, no entanto, nos ensaios *in vitro* foi possível demonstrar que outras cepas, TgCTBr17 e TgCTBR23, também possibilitam o uso destes fármacos, diminuindo a proliferação do parasito na concentração mais alta utilizada durante o estudo (SDZ 125 + PYR 0,5  $\mu$ M).

Embora pertencentes de um mesmo genótipo, as cepas TgCTBr4 e TgCTBr17 responderam de maneira contrária nos ensaios *in vitro*, reafirmando o proposto por Meneceur et al. (2008), que cepas de um mesmo genótipo podem apresentar padrões de suscetibilidade diferentes entre si.

## 7. CONCLUSÕES

A partir dos ensaios *in vivo* realizados durante este estudo foi possível observar a eficácia da associação de SDZ e PYR para os animais infectados pela cepa TgCTBr11, resultado esse que não foi positivo dentre as demais cepas. Seguindo ao uso de CLN, a TgCTBr11 e TgCTBr23 se demonstraram suscetíveis ao uso do fármaco, no entanto, as cepas TgCtBr4 e TgCTBr17 mostraram um possível fenótipo de resistência a CLN, observando uma baixa suscetibilidade do fármaco em tratar os animais infectados por essas cepas. Com relação a SMT e TMP, foi concluído que os fármacos de maneira única ou combinada auxiliaram no aumento da sobrevida dos animais dentre as quatro cepas estudadas.

Um fato interessante é a representação da cura dos animais tratados com PYR 6,26 + SDZ 20 e SMT 200 + TMP 200 mg/kg/dia da cepa TgCTBr11, os quais não apresentaram a presença de cistos no cérebro e IgG positivo para *T. gondii*.

Nos ensaios antiproliferativos *in vitro* bem como ensaios *in vivo*, o uso de SDZ e PYR para tratamento de células e animais infectados pela cepa TgCTBr4 não foi demonstrado como um bom tratamento. Nesse caso, a associação de SMT e TMP seria um tratamento eficaz, podendo vir a ser utilizado pois auxiliaram na diminuição de proliferação do parasito.

Diferente dos ensaios *in vivo*, o uso da ATV em concentração mais alta auxiliou na diminuição da proliferação dos parasitos nos ensaios *in vitro* de ambas as cepas, com exceção da TgCTBr4.

As cepas TgCTBr11, TgCTBr17 e TgCTBr23 apresentam uma suscetibilidade ao uso de SDZ e PYR nos ensaios *in vitro*. No entanto, esse resultado ainda é contraditório para as cepas TgCTBr17 e TgCTBr23 uma vez que estas não apresentaram um melhora e aumento da sobrevida dos animais com a utilização desses fármacos no tratamento da toxoplasmose experimental.

Devem ser realizados ainda ensaios adicionais a fim de caracterizar de maneira mais aprofundada a suscetibilidade *in vivo* dos animais frente ao uso de ATV, aumentando a concentração de estudo para correlacionar com os ensaios *in vitro* encontrados neste estudo. Além disso, estudos *in vitro* adicionais utilizando a CLN como tratamento também devem ser realizados.

## REFERÊNCIAS

- ADL, S. M. et al. The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 59, n. 5, p. 429–514, 2012.
- AJZENBERG, D.; DUMETRE, A.; DARDÉ, M. L. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *Journal of clinical microbiology*, v. 43, n. 4, p. 1940-1943, 2005.
- ALDAY, P. H.; DOGGETT, J. S. Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 11, p. 273–293, 2017.
- ALVES, C. F.; VITOR, R. W. A. Efficacy of atovaquone and sulfadiazine in the treatment of mice infected with *Toxoplasma gondii* strains isolated in Brazil. *Parasite (Paris, France)*, v. 12, n. 2, p. 171–177, 2005.
- ANDRADE, M. M. C. Prevalência da toxoplasmose em ovinos e caracterização molecular de isolados de *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) obtidos de animais de produção no Estado do Rio Grande do Norte. Tese de doutorado. Belo Horizonte, 2012.
- ARAUJO, F. G.; HUSKINSON, J.; REMINGTON, J. S. Remarkable in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 566C80 against tachyzoites and tissue cysts of *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 35, n. 2, p. 293-299, 1991.
- ARAUJO, F. G.; REMINGTON, J. S. Effect of Clindamycin on Acute and Chronic Toxoplasmosis in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 5, n. 6, p. 647–651, 1974.
- ARTIGAS, R. S. et al. Aspectos básicos sobre la patogenia, respuesta inmune y bioseguridad en el trabajo con el *Toxoplasma gondii*. *Correo Científico Médico de Holguín*, v. 16, n. 1, 2012.
- ASPINALL, T. V. et al. The molecular basis of sulfonamide resistance in *Toxoplasma gondii* and implications for the clinical management of toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 185, n. 11, p. 1637–1643, 2002.
- AUN, F. G. Toxoplasmose cerebral em pessoas que vivem com HIV/aids: perfil epidemiológico, clínico, terapêutico e de neuroimagem. 2019.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerging infectious diseases*, v. 9, n. 1, p. 55, 2003.
- BARBOSA, H. S. et al. Toxoplasmose & *Toxoplasma gondii*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. Cap. 2. p. 33-45. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/p2r7v>. Acesso em: 14 out. 2021.
- BARBOSA, H. S.; MUNO, R. M.; MOURA, M. A. O ciclo evolutivo. In: SOUZA, W.; BELFORT JR, R. Toxoplasmose & *Toxoplasma gondii*. 2014.
- BELFORT, R. N. et al. High prevalence of unusual genotypes of *Toxoplasma gondii* infection in pork meat samples from Erechim, Southern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 79, p. 111–114, 2007.
- BISSO-ANDRADE, A. Resistencia a los antimicrobianos. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*, v. 31, n. 2, p. 50-59, 2018.
- BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 64, n. 3, p. 607-623, 2000.

- BLADER, I. J. et al. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. *Annual review of microbiology*, v. 69, p. 463-485, 2015.
- BÓIA, M. N. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauareté, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 50, p. 17-20, 2008.
- BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Current Opinion in Microbiology*, v. 5, n. 4, p. 438-442, 2002.
- BOSCH-DRIESSEN, L. H. et al. A prospective, randomized trial of pyrimethamine and azithromycin vs pyrimethamine and sulfadiazine for the treatment of ocular toxoplasmosis. *American Journal of Ophthalmology*, v. 134, n. 1, p. 34-40, jul. 2002.
- BRANDÃO, G. P. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. *Parasite*, v. 13, n. 2, p. 143-149, 2006.
- BRANDÃO, G. P. et al. Experimental reinfection of BALB/c mice with different recombinant type I/III strains of *Toxoplasma gondii*: involvement of IFN- $\gamma$  and IL-10. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 2, p. 241-245, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Portaria nº 7, de 4 de março de 2020. Brasília, 2020.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, p. 611-22, 2009.
- CAMPINA, M. T.; QUEIROZ-FERNANDES, G. M. DE. Neurotoxoplasmose em pacientes imunocomprometidos e a relevância do diagnóstico por imagem. *Rev. Salusvita (Online)*, p. 421-435, 2018.
- CAMILO, L. M. et al. Molecular diagnosis of symptomatic toxoplasmosis: a 9-year retrospective and prospective study in a referral laboratory in Sao Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 21, p. 638-647, 2017.
- CARNEIRO, A. C. A. V. et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. *Journal of clinical microbiology*, v. 51, n. 3, p. 901-907, 2013.
- CASTRO, M. T. et al. Infección con *Toxoplasma gondii* (Eucoccidiorida: Sarcocystidae) en murciélagos de Campeche y Yucatán, México. *Revista de Biología Tropical*, v. 67, n. 3, p. 633-642, 2019.
- CAVALCANTE, A. C. R. et al. Virulence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolated from goats in Ceará, Brazil. *Small Ruminant Research*, v. 69, n. 1, p. 79-82, 2007.
- CHIRGWIN, K. et al. Randomized phase II trial of atovaquone with pyrimethamine or sulfadiazine for treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: ACTG 237/ANRS 039 Study. *AIDS Clinical Trials Group 237/Agence Nationale de Recherche sur le SIDA, Essai 039. Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 34, n. 9, p. 1243-1250, 2002.

- CHORLTON, S. D. Adjunctive bradyzoite-directed therapy for reducing complications of congenital toxoplasmosis. *Medical Hypotheses*, v. 133, p. 109376, 2019.
- CHOW, T. G.; KHAN, D. A. Sulfonamide hypersensitivity. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, p. 1-13, 2022.
- COHEN, S. et al. *Immunology of parasitic infections*. Blackwell Scientific Publications Ltd, Osney Mead, Oxford, OX2 OEL., 1976.
- COOMBS, G. H.; MÜLLER, S. Recent advances in the search for new anti-coccidial drugs. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 5, p. 497–508, 2002.
- CRISTINA, N. et al. A DNA fingerprinting method for individual characterization of *Toxoplasma gondii* strains: combination with isoenzymatic characters for determination of linkage groups. *Parasitology Research*, v. 81, n. 1, p. 32–37, 1995.
- DARDÉ, M. L.; BOUTEILLE, B.; PESTRE-ALEXANDRE, M. Isoenzyme Analysis of 35 *Toxoplasma gondii* Isolates and the Biological and Epidemiological Implications. *The Journal of Parasitology*, v. 78, n. 5, p. 786–794, 1992.
- DE ARAUJO JORGE, T. C.; SOUZA, W. Effect of carbohydrates, periodate and enzymes in the process of endocytosis of *Trypanosoma cruzi* by macrophages. *Acta tropica*, v. 41, n. 1, p. 17-28, 1984.
- DE LIMA BESSA, G.; DE ALMEIDA VITOR, R. W.; DOS SANTOS MARTINS-DUARTE, E. *Toxoplasma gondii* in South America: a differentiated pattern of spread, population structure and clinical manifestations. *Parasitology Research*, v. 120, n. 9, p. 3065–3076, 2021.
- DE MELO FERREIRA, A. et al. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR–RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 6, n. 1, p. 22–31, 2006.
- DEDICOAT, M.; LIVESLEY, N. Management of toxoplasmic encephalitis in HIV-infected adults (with an emphasis on resource-poor settings). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 3, 2006.
- DE-LA-TORRE, A. et al. Therapy for ocular toxoplasmosis. *Ocular Immunology and Inflammation*, v. 19, n. 5, p. 314–320, 2011.
- DELHAES, L. et al. Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. *Prenatal diagnosis*, v. 30, n. 9, p. 902–905, 2010.
- DOLIWA, C. et al. Sulfadiazine resistance in *Toxoplasma gondii*: no involvement of overexpression or polymorphisms in genes of therapeutic targets and ABC transporters. *Parasite*, v. 20, 2013.
- DUBEY, J. P. Diagnosis. In: *Toxoplasmoses of animals and humans*. 2<sup>o</sup> ed. Boca Raton: CRC Press, Session 1.7, p. 52-71, 2010.
- DUBEY, J. P. et al. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, Brazil. *Journal of Parasitology*, v. 93, n. 1, p. 60–64, 2007.
- DUBEY, J. P. The History of *Toxoplasma gondii*—The First 100 Years. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 55, n. 6, p. 467–475, 2008.

- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press, Inc., 1988.
- DUBEY, J. P.; CRUTCHLEY, C. *Toxoplasmosis in wallabies (Macropus rufogriseus and Macropus eugenii): blindness, treatment with atovaquone, and isolation of Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*, v. 94, n. 4, p. 929-933, 2008.
- DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. *Structures of Toxoplasma gondii Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 2, p. 267–299, 1998.
- DUNAY, I. R. et al. *Treatment of Toxoplasmosis: Historical Perspective, Animal Models, and Current Clinical Practice*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 31, n. 4, p. e00057-17, out. 2018.
- FERREIRA, A. I. et al. *Risk factors for ocular toxoplasmosis in Brazil*. *Epidemiology and Infection*, v. 142, n.1, p. 142–148, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0950268813000526>
- FRANCISCO, F. M. et al. *Seroprevalence of toxoplasmosis in a low-income community in the São Paulo municipality, SP, Brazil*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, [S.L.]*, v. 48, n. 3, p. 167-170, 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652006000300009>.
- FRAZÃO-TEIXEIRA, E. et al. *Multi-locus DNA sequencing of Toxoplasma gondii isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains*. *Veterinary Parasitology*, v. 175, n. 1, p. 33–39, 2011.
- GARIN, J. P.; EYLES, D. E. [Spiramycin therapy of experimental toxoplasmosis in mice]. *La Presse Medicale*, v. 66, n. 42, p. 957–958, 1958.
- GILBERT, R. E. et al. *Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 2, n. 8, p. e277, 2008.
- GILBERT, R. E.; STANFORD, M. R. *Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection?*. *British Journal of Ophthalmology*, v. 84, n. 2, p. 224-226, 2000.
- GÓMEZ, A. S. et al. *Toxoplasmosis: Sus formas clinicas*. *Rev. Posg. Via Cát. Med*, v. 165, p. 15-19, 2007.
- GÓMEZ-MARÍN, J. E. *Toxoplasmose congênita em crianças sul-americanas: [revisão]*. *Sci. med*, 2010.
- GROSSMAN, P. L.; REMINGTON, J. S. *The effect of trimethoprim and sulfamethoxazole on Toxoplasma gondii in vitro and in vivo*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 28, n. 3, p. 445-455, 1979.
- HOSSEINI, S. M.; ABRISHAMI, M.; MEHDI ZADEH, M. *Intravitreal Clindamycin in the Treatment of Unresponsive Zone One Toxoplasmic Chorioretinitis: A Case Report*. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, v. 16, n. 11, p. e15428, 2014.
- HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease*. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 172, n. 6, p. 1561–1566, 1995.
- JACOBS, L.; LUNDE, F. *The interrelation of toxoplasmosis in swine, cattle, dogs and man*. *Public Health Reports, Washington*, v. 72, n.10, p. 872-882, 1957.

- JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Epidemiologia da Toxoplasmose. In: SOUZA, W.; BELFORT JR, R. Toxoplasmose & *Toxoplasma gondii*. 2014.
- KAMYA, M. R. et al. Effects of trimethoprim-sulfamethoxazole and insecticide-treated bednets on malaria among HIV-infected Ugandan children. *Aids*, v. 21, n. 15, p. 2059-2066, 2007.
- KATLAMA, C. et al. Pyrimethamine-clindamycin vs. pyrimethamine-sulfadiazine as acute and long-term therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 22, n. 2, p. 268–275, 1996.
- KHAN, A. et al. Activity of trovafloxacin in combination with other drugs for treatment of acute murine toxoplasmosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 41, n. 5, p. 893-897, 1997.
- KHAN, A. et al. Genetic Divergence of *Toxoplasma gondii* Strains Associated with Ocular Toxoplasmosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, n. 6, p. 942–949, 2006.
- KIEFFER, F.; WALLON, M. Chapter 112 - Congenital toxoplasmosis. In: DULAC, O.; LASSONDE, M.; SARNAT, H. B. (Eds.). . *Handbook of Clinical Neurology. Pediatric Neurology Part II*. [s.l.] Elsevier, 2013. v. 112p. 1099–1101.
- LANGONI, H. et al. Utilização do método de aglutinação direta e da reação de imunofluorescência indireta na detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em cavalos naturalmente infectados. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 44, n. 1, p. 27-32, 2007.
- LEPORT, C. et al. Treatment of central nervous system toxoplasmosis with pyrimethamine/sulfadiazine combination in 35 patients with the acquired immunodeficiency syndrome: efficacy of long-term continuous therapy. *The American journal of medicine*, v. 84, n. 1, p. 94-100, 1988.
- LOPES, C. C. H.; BERTO, B. P. Aspectos associados à toxoplasmose: Uma referência aos principais surtos no Brasil. *Saúde & Ambiente em Revista*, v. 7, n. 2, p. 1–7, 2012.
- MAENZ, M. et al. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, v. 39, p. 77–106, 2014.
- MALDONADO, Y. A. et al. Diagnosis, treatment, and prevention of congenital toxoplasmosis in the United States. *Pediatrics*, v. 139, n. 2, 2017.
- MAREZE, M. et al. Socioeconomic vulnerability associated to *Toxoplasma gondii* exposure in southern Brazil. *PLoS One*, v. 14, n. 2, p. e0212375, 2019.
- MARTINS-DUARTE, E. S. et al. In vitro activity of N-phenyl-1,10-phenanthroline-2-amines against tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 50, p. 116467, 2021.
- MARTINS-DUARTE, E. S. et al. Ciprofloxacin derivatives affect parasite cell division and increase the survival of mice infected with *Toxoplasma gondii*. *PLoS One*, v. 10, n. 5, p. e0125705, 2015.
- MARTINS-DUARTE, E. S.; DE SOUZA, W.; VOMMARO, R. C. *Toxoplasma gondii*: the effect of fluconazole combined with sulfadiazine and pyrimethamine against acute toxoplasmosis in murine model. *Experimental parasitology*, v. 133, n. 3, p. 294-299, 2013.

MARZOLA, P. E. R. Incidência de toxoplasmose congênita e fatores associados em um hospital no sul do Brasil. 2021.

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

MCFADDEN, D. C. et al. Characterization of cytochrome b from *Toxoplasma gondii* and Qo domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 108, n. 1, p. 1–12, 2000.

MEDEIROS, L. C. Interação de *Toxoplasma gondii* e células epiteliais intestinais de felinos in vitro. 2019. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

MELO, L. M. C. DE; PAULISTA, M. T.; SÁNCHEZ, T. E. G. Neurotoxoplasmose em pacientes portadores de Imunodeficiência Humana e suas sequelas: Uma revisão narrativa / Neurotoxoplasmosis in patients with Human Immunodeficiency and its sequelae: A narrative review. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 10, p. 81527–81538, 2020.

MENECEUR, P. et al. In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 4, p. 1269–1277, 2008.

MINEO, J. R.; VITOR, R. W. A. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. *Parasitologia Humana*. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016. Cap. 18. p. 181-192.

MONTAZERI, M. et al. Drug Resistance in *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 2587, 2018.

MOURA, I. P. S. et al. Conhecimento e comportamento preventivo de gestantes sobre Toxoplasmose no município de Imperatriz, Maranhão, Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, [S.L.], v. 24, n. 10, p. 3933-3946, 2019. *FapUNIFESP (SciELO)*.  
<http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320182410.21702017>.

MOURA, M. A.; AMENDOEIRA, M. R. R.; BARBOSA, H. S. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 862-864, 2009.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5215, Sulfadiazine. Disponível em:  
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfadiazine>>. Acesso em: 4 fev. 2023.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 4993, Pyrimethamine. Disponível em:  
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyrimethamine>>. Acesso em: 4 fev. 2023.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5329, Sulfamethoxazole. Disponível em:  
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfamethoxazole>>. Acesso em: 4 fev. 2023.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 5578, Trimethoprim. Disponível em:  
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trimethoprim>>. Acesso em: 4 fev. 2023.



National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 446598, Clindamycin. Disponível em:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clindamycin>>. Acesso em: 4 fev. 2023.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 74989, Atovaquone. Disponível em:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atovaquone>>. Acesso em: 4 fev. 2023.

NETO, E. C. et al. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. *International journal of epidemiology*, v. 29, n. 5, p. 941-947, 2000.

NICOLLE, C; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *CR Seances l'académie des sciences*, v. 147, n. 763, 1908.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, v. 39, n. 12, p. 1385–1394, 2009.

PELPHREY, P. M. et al. Highly efficient ligands for dihydrofolate reductase from *Cryptosporidium hominis* and *Toxoplasma gondii* inspired by structural analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 50, n. 5, p. 940–950, 2007.

PENA, H. F. J. et al. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology*, v. 38, n. 5, p. 561–569, 2008.

PIKETTY, C. et al. In vivo assessment of antimicrobial agents against *Toxoplasma gondii* by quantification of parasites in the blood, lungs, and brain of infected mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 34, n. 8, p. 1467-1472, 1990.

PINHEIRO, B. V. et al. Pathological changes in acute experimental toxoplasmosis with *Toxoplasma gondii* strains obtained from human cases of congenital disease. *Experimental parasitology*, v. 156, p. 87-94, 2015.

RANG, H. P. et al. *Rang & Dale: Farmacologia*. Elsevier Brasil, 8ª ed., 2015.

ROLSTON, K. V. I.; HOY, J. Role of clindamycin in the treatment of central nervous system toxoplasmosis. *The American Journal of Medicine*, v. 83, n. 3, p. 551–554, 1987.

RORMAN, E. et al. Congenital toxoplasmosis -prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. *Reproductive Toxicology*, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 458-472, 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.10.006>.

SAMPAIO, G. L. et al. Toxoplasmose congênita na atenção primária a saúde: importância da prevenção no controle de uma doença negligenciada. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, v. 10, n. 4, 2020.

SANTOS, R. A. DOS; ROCHA, I. T. M. DA; RAMOS, R. Toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos: aspectos epidemiológicos e clínicos. *Bol. epidemiol. (Porto Alegre, Online)*, p. 3–8, 2015.

SCHERER, C. B.; BOTONI, L. S.; COSTA-VAL, A. P. Mecanismos de ação de antimicrobianos e resistência bacteriana. *Veterinária*, v. 4, n. 13, p. 12-20, 2016.

SCHLITZER, M. Malaria chemotherapeutics part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development. *ChemMedChem*, v. 2, n. 7, p. 944–986, 2007.

- SEVÁ, A. P. et al. Avaliação da virulência de cepas de *Toxoplasma gondii*, em camundongos, isoladas de cães com sinais neurológicos, em Botucatu, SP. 2006.
- SHWAB, E. K. et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*, v. 141, n. 4, p. 453–461, 2014.
- SIBLEY, L. D.; MORDUE, D.; HOWE, D. K. Experimental Approaches to Understanding Virulence in Toxoplasmosis. *Immunobiology*, v. 201, n. 2, p. 210–224, 1999.
- SILVA, L. A. Caracterização molecular de *Toxoplasma gondii* isolado de cães, galinhas e casos humanos de toxoplasmose congênita no estado de Minas Gerais, Brasil. Tese de doutorado. Belo Horizonte, Brasil, 2014.
- SILVA, L. A. et al. Efficacy of sulfadiazine and pyrimetamine for treatment of experimental toxoplasmosis with strains obtained from human cases of congenital disease in Brazil. *Experimental parasitology*, v. 202, p. 7-14, 2019.
- SILVA, L. A. et al. Genetic polymorphisms and phenotypic profiles of sulfadiazine-resistant and sensitive *Toxoplasma gondii* isolates obtained from newborns with congenital toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil. *PloS one*, v. 12, n. 1, p. e0170689, 2017.
- SILVA, L. A. et al. Overlapping *Toxoplasma gondii* Genotypes Circulating in Domestic Animals and Humans in Southeastern Brazil. *PLOS ONE*, v. 9, n. 2, p. e90237, 2014.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. Departamento Científico de Neonatologia. Toxoplasmose congênita. Documento Científico, jul. 2020. Disponível em: <[https://www.sbp.com.br/fileadmin/user\\_upload/22620c-DC\\_-\\_Toxoplasmose\\_congenita.pdf](https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/22620c-DC_-_Toxoplasmose_congenita.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- SOUZA, W. DE et al. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. *Scientia Medica*, v. 20, n. Extra 1, p. 22, 2010.
- STAINES, H. M. et al. Clinical implications of Plasmodium resistance to atovaquone/proguanil: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 73, n. 3, p. 581-595, 2018.
- SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. *International Journal for Parasitology*, v. 36, n. 7, p. 841–848, 2006.
- SUSSMANN, O.; MATTOS, L.; RESTREPO, A. Resistencia bacteriana. *Univ Med*, v. 43, n. 1, p. 20-6, 2002.
- TABBARA, K. F.; O'CONNOR, G. R. Treatment of Ocular Toxoplasmosis with Clindamycin and Sulfadiazine. *Ophthalmology*, v. 87, n. 2, p. 129–134, 1980.
- TÁVORA, M. P. F. et al. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar *Leishmania sp* em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, p. 482-483, 2007.
- THERA, M. A. et al. Impact of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis on falciparum malaria infection and disease. *The Journal of infectious diseases*, v. 192, n. 10, p. 1823-1829, 2005.
- VAIDYA, A. B.; MATHER, M. W. Mitochondrial Evolution and Functions in Malaria Parasites. *Annual Review of Microbiology*, v. 63, n. 1, p. 249–267, 2009.

VALLADARES, B. T. N. et al. Toxoplasmosis ocular: aspectos clínico-epidemiológicos en edad pediátrica. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, v. 24, n. 4, p. 4457, 2020.

VASCONCELOS-SANTOS, D. V. et al. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. *Ophthalmology*, v. 116, n. 11, p. 2199-2205. e1, 2009.

VENANZI, E.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Resistencia a los antimaláricos. *Rev Esp Quimioter*, v. 29, n. 1, p. 72-75, 2016.

VINETZ, J. M. et al. Quimioterapia da malária. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman*. 12. ed. New York: AMGH, 2012. Cap. 49. p. 1383-1417.

WALCHER, D. L.; COMPARSI, B.; PEDROSO, D. Toxoplasmose gestacional: uma revisão. *Brazilian Journal of Clinical Analyses*, v. 49, n. 4, p. 323-7, 2017.

WALLON, M.; PEYRON, F. Congenital Toxoplasmosis: A Plea for a Neglected Disease. *Pathogens*, v. 7, n. 1, p. 25, 2018.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida. *Uso racional de medicamentos: temas selecionados*, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004.

ZHANG, J. L. et al. New life for an old drug: In vitro and in vivo effects of the anthelmintic drug niclosamide against *Toxoplasma gondii* RH strain. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance*, v. 9, p. 27–34, 2019.

ZHANG, Y.; LIN, X.; LU, F. Current treatment of ocular toxoplasmosis in immunocompetent patients: a network meta-analysis. *Acta tropica*, v. 185, p. 52-62, 2018.

## ANEXOS



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Certidão**  
**Cadastro nº A736DE6**

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A736DE6**  
 Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**  
 CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

**Espécie**

**Toxoplasma gondii**

**Toxoplasma gondii**

**Toxoplasma gondii**

Título da Atividade: **Identificação de novos alvos e avaliação da atividade de fármacos e compostos na proliferação aguda e crônica do protozoário Toxoplasma gondii em modelos in vitro e in vivo com os isolados TgCTBr**

**Equipe**

<b>RICARDO WAGNER DE ALMEIDA VITOR</b>	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b>
<b>Sheila Cristina Nardelli</b>	<b>Instituto Carlos Chagas-Fiocruz PR</b>
<b>Erica dos Santos Martins Duarte</b>	<b>UFMG</b>
<b>Gabriela de Lima Bessa</b>	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b>
<b>Kenya Mara de Souza Malta</b>	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b>
<b>Mariana Torquato Quezado de Magalhães</b>	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b>
<b>Diego Rodney Rodrigues de Assis</b>	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b>

**Resultados Obtidos**

**Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Artigos científicos: doi10.1128/JCM.02502-12**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Tese defendida por Ana Carolina de Aguiar Vas**

Identificação do meio onde foi divulgado: **-Dissertação defendida por Breno Veloso Pinhe**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Artigos científicos: doi10.1016/j.exppara.2015.0**



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 152/2021

**Título do projeto:** Caracterização do perfil de resistência cruzada de cepas de *Toxoplasma gondii* com baixa suscetibilidade a sulfadiazina em camundongos resistentes e suscetíveis

**Finalidade:** Pesquisa

**Pesquisador responsável:** Erica dos Santos Martins Duarte

**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas

**Departamento:** Departamento de Parasitologia

**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 12/07/2021. Validade: 12/07/2021 à 11/07/2026

Belo Horizonte, 12/07/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)