

**MATHEUS DELGADO FERNANDES**

**EFEITO DA SULFADIAZINA E DA PIRIMETAMINA, ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO, SOBRE ISOLADOS DE *Toxoplasma gondii* OBTIDOS DE HUMANOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA EM MINAS GERAIS.**

**Belo Horizonte  
Minas Gerais  
2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG

Instituto de Ciências Biológicas – ICB

Pós-Graduação em Parasitologia

**EFEITO DA SULFADIAZINA E DA PIRIMETAMINA, ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO, SOBRE ISOLADOS DE *TOXOPLASMA GONDII* OBTIDOS DE HUMANOS COM TOXOPLASMOSE CONGÊNITA EM MINAS GERAIS.**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor

**Colaboradora:** Msc. Letícia de Azevedo Silva

**MATHEUS DELGADO FERNANDES**

Belo Horizonte, MG

2014

Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

*Ao meu pai Clever,  
Minha mãe Cláudia,  
E a Amanda,  
Por todo o carinho e apoio*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia ICB/UFMG, na pessoa da Coordenadora Professora Érika Martins Braga, pela oportunidade e toda a estrutura para desenvolver este trabalho.

Ao meu orientador, Ricardo Wagner de Almeida Vítor, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação, paciência e dedicação.

À Rosa, por todos os conselhos e inestimável apoio técnico.

À Letícia de Azevedo Silva, pela colaboração neste trabalho.

A todos os colegas e amigos de laboratório, Breno, Mariana, Júlia, Carol, Anderson, Alice e Daliane, pela convivência, diversão e apoio.

A toda a turma do mestrado (Lado B) pelos momentos de descontração e companheirismo.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Sumara e Sibebe, pela atenção e interesse.

A FAPEMIG pelo fornecimento da bolsa de estudos.

A todos que tive oportunidade de conhecer durante o mestrado e que, de alguma forma, contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional durante esse período.

A todos que fazem parte da minha vida e me ajudaram a chegar até aqui, em especial meus pais e a Amanda.

Muito Obrigado!

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Classificação, biologia e ciclo de vida.....	1
1.2. Diversidade genética de <i>T. gondii</i> .....	4
1.3. Toxoplasmose: doença x infecção.....	6
1.4. Quimioterapia da toxoplasmose .....	7
1.5. Técnicas de avaliação a susceptibilidade de <i>T. gondii</i> a quimioterapia.....	11
2. Justificativa.....	13
3. Objetivos.....	14
3.1. Objetivo geral.....	14
3.2. Objetivos específicos.....	14
4. Metodologia.....	15
4.1. Animais.....	15
4.2. Parasitos.....	15
4.3. Delineamento experimental.....	17
4.4. Preparo dos medicamentos.....	18
4.5. Grupos experimentais.....	18
4.6. Acompanhamento dos camundongos.....	20
4.6.1. ELISA.....	20
4.6.2. Pesquisa de cistos.....	22
4.6.3. Bioensaio.....	22
4.7. Análise estatística.....	23
5. Resultados.....	24
5.1. Avaliação da toxicidade de diferentes dosagens de Sulfadiazina e Pirimetamina para camundongos.....	24
5.2. Tratamento de camundongos infectados com a cepa TgCTBr 1 (#206) utilizando Sulfadiazina e Pirimetamina, isoladamente e em associação.....	24
5.3. Tratamento de camundongos infectados com a cepa TgCTBr 25 (#206) utilizando Sulfadiazina e Pirimetamina, isoladamente e em associação.....	30
5.4. Tratamento de camundongos infectados com a cepa TgCTBr 4 (#108) utilizando Sulfadiazina e Pirimetamina, isoladamente e em associação.....	35
5.5. Tratamento de camundongos infectados com a cepa TgCTBr 17 (#108) utilizando Sulfadiazina e Pirimetamina, isoladamente e em associação.....	40

5.6. Tratamento de camundongos infectados com a cepa TgCTBr 9 (#Br II) utilizando Sulfadiazina e Pirimetamina, isoladamente e em associação.....	45
5.7. Tratamento de camundongos infectados com a cepa TgCTBr 13 (#208) utilizando Sulfadiazina e Pirimetamina, isoladamente e em associação.....	50
5.8. Tratamento de camundongos infectados com a cepa TgCTBr 23 (#41) utilizando Sulfadiazina e Pirimetamina, isoladamente e em associação.....	55
6. Discussão.....	59
6.1. Efeito da Sulfadiazina isoladamente sobre diferentes cepas de <i>T. gondii</i> , genotipicamente atípicas.....	60
6.2. Efeito da Pirimetamina isoladamente sobre diferentes cepas de <i>T. gondii</i> , genotipicamente atípicas.....	63
6.3. Efeito da associação de uma baixa dosagem de Sulfadiazina e Pirimetamina sobre diferentes cepas de <i>T. gondii</i> , genotipicamente atípicas.....	66
7. Conclusões.....	70
8. Referências bibliográficas.....	71
9. Anexo.....	80
9.1. Certificado de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - Protocolo CEUA nº 257/2012.....	80

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é o agente causador da toxoplasmose, uma doença de grande prevalência mundial, de especial interesse em pacientes imunodeficientes e gestantes. A toxoplasmose no Brasil apresenta grande interesse para pesquisa, devido a maior gravidade dos casos humanos ocorridos no país, principalmente em função dos genótipos atípicos predominantes. O tratamento da toxoplasmose é, em geral, realizado através da combinação da Sulfadiazina e da Pirimetamina. No entanto, por diversas razões, uma série de casos tratados apresenta evolução não satisfatória e/ou efeitos adversos significativos, que podem requerer a interrupção do tratamento. Neste trabalho, camundongos Swiss foram infectados com sete cepas de *T. gondii* isoladas de recém nascidos com toxoplasmose congênita (TgCTBr1, TgCTBr4, TgCTBr9, TgCTBr13, TgCTBr17, TgCTBr23, TgCTBr25), de genótipo atípico e virulentas para camundongos. Os animais foram divididos em 10 grupos de tratamento: SDZ10, SDZ40, SDZ160, SDZ640 – tratados via oral com 10 à 640mg/kg por dia de Sulfadiazina; PM3, PM12, PM50, PM200 – tratados via oral com 3 à 200mg/kg por dia de Pirimetamina e SDZ+PM – tratado com uma combinação da menor dosagem das duas drogas. Os camundongos foram avaliados para mortalidade e presença de cistos cerebrais. ELISA e bioensaios também foram usados para determinar a eficácia dos esquemas terapêuticos. Foi observado que as cepas TgCTBr4 e TgCTBr17 (pertencentes ao genótipo #108 do ToxoDB - <http://toxodb.org/toxo/>) apresentaram menor susceptibilidade ao tratamento, enquanto TgCTBr9 (com genótipo BrII) foi a que apresentou maior sensibilidade ao tratamento, com ambos medicamentos. A associação de Sulfadiazina e Pirimetamina, em dosagens reduzidas, proporcionou um tratamento mais eficaz na toxoplasmose experimental com cepas de *T. gondii* isoladas no Brasil.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is the parasite responsible for toxoplasmosis, a disease with prevalence around the world and is of great interest on immunocompromised patients and pregnant women. Toxoplasmosis in Brazil presents great research interest because of the bigger severity of native cases, especially due to the predominant atypic genotypes. Toxoplasmosis is, usually, treated with the combination of Sulfadiazine and Pyrimethamin. However, for many reasons, a series of cases do not present satisfactory evolution and/or significant adverse effects, which can lead to treatment interruption. In this work, Swiss mice were infected with seven different strains of *T. gondii*, isolated from newborns with congenital toxoplasmosis (TgCTBr1, TgCTBr4, TgCTBr9, TgCTBr13, TgCTBr17, TgCTBr23, TgCTBr25), with atypic genotypes and virulent for mice. The animals were divided into 10 treatment groups: SDZ10, SDZ40, SDZ160, SDZ640 – treated with 10 to 640mg/kg per day of Sulfadiazine; PM3, PM12, PM50, PM200 – treated with 3 to 200mg/kg per day of Pyrimethamin and SDZ+PM – treated with a combination of the lower dosage of both drugs. The mice were evaluated for mortality and presence of brain cysts. ELISA and bioassays were also used to determine the efficacy of the therapeutic schemes. It was observed that the TgCTBr4 and TgCTBr17 strains (from the #108 genotype of ToxoDB - <http://toxodb.org/toxo/>) presented less susceptibility to treatment, while TgCTBr9 (with BrII genotype) was the one with most sensibility to treatment with both drugs. The association between Sulfadiazine e Pyrimethamin, in reduced dosages, presented a more effective treatment for experimental toxoplasmosis with *T. gondii* strains isolated in Brazil.

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 01: Genótipos de cepas de *Toxoplasma gondii* utilizados neste estudo, com a mesorregião de origem do isolamento, apresentação clínica no recém nascido e virulência em camundongos (adaptado de Carneiro et al, 2013).....16

Tabela 1: Sobrevivência e número médio de cistos cerebrais de camundongos inoculados com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 1 de *Toxoplasma gondii* e tratados com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), 48 horas após a infecção, durante 10 dias e acompanhados durante 30 dias.....28

Tabela 2: Presença de cistos cerebrais e resultado sorológico de camundongos subinoculados com cérebros de camundongos previamente infectados com a cepa TgCTBr 1 de *Toxoplasma gondii* e acompanhados durante 30 dias (bioensaio).....29

Tabela 3: Sobrevivência e número médio de cistos cerebrais de camundongos inoculados com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 25 de *Toxoplasma gondii* e tratados com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), 48 horas após a infecção, durante 10 dias e acompanhados durante 30 dias.....33

Tabela 4: Presença de cistos cerebrais e resultado sorológico de camundongos subinoculados com cérebros de camundongos previamente infectados com a cepa TgCTBr 25 de *Toxoplasma gondii* e acompanhados durante 30 dias (bioensaio).....34

Tabela 5: Sobrevivência e número médio de cistos cerebrais de camundongos inoculados com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 4 de *Toxoplasma gondii* e tratados com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), 48 horas após a infecção, durante 10 dias e acompanhados durante 30 dias.....38

Tabela 6: Presença de cistos cerebrais e resultado sorológico de camundongos subinoculados com cérebros de camundongos previamente infectados com a cepa TgCTBr 4 de *Toxoplasma gondii* e acompanhados durante 30 dias (bioensaio).....39

Tabela 7: Sobrevivência e número médio de cistos cerebrais de camundongos inoculados com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 17 de *Toxoplasma gondii* e tratados com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), 48 horas após a infecção, durante 10 dias e acompanhados durante 30 dias.....43

Tabela 8: Presença de cistos cerebrais e resultado sorológico de camundongos subinoculados com cérebros de camundongos previamente infectados com a cepa TgCTBr 17 de *Toxoplasma gondii* e acompanhados durante 30 dias (bioensaio).....44

Tabela 9: Sobrevivência e número médio de cistos cerebrais de camundongos inoculados com $10^4$ taquizoítos da cepa TgCTBr 9 de <i>Toxoplasma gondii</i> e tratados com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), 48 horas após a infecção, durante 10 dias e acompanhados durante 30 dias.....	48
Tabela 10: Presença de cistos cerebrais e resultado sorológico de camundongos subinoculados com cérebros de camundongos previamente infectados com a cepa TgCTBr 9 de <i>Toxoplasma gondii</i> e acompanhados durante 30 dias (bioensaio).....	49
Tabela 11: Sobrevivência e número médio de cistos cerebrais de camundongos inoculados com $10^4$ taquizoítos da cepa TgCTBr 13 de <i>Toxoplasma gondii</i> e tratados com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), 48 horas após a infecção, durante 10 dias e acompanhados durante 30 dias.....	53
Tabela 12: Presença de cistos cerebrais e resultado sorológico de camundongos subinoculados com cérebros de camundongos previamente infectados com a cepa TgCTBr 13 de <i>Toxoplasma gondii</i> e acompanhados durante 30 dias (bioensaio).....	54
Tabela 13: Sobrevivência e número médio de cistos cerebrais de camundongos inoculados com $10^4$ taquizoítos da cepa TgCTBr 23 de <i>Toxoplasma gondii</i> e tratados com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), 48 horas após a infecção, durante 10 dias e acompanhados durante 30 dias.....	58
Tabela 14: Presença de cistos cerebrais e resultado sorológico de camundongos subinoculados com cérebros de camundongos previamente infectados com a cepa TgCTBr 23 de <i>Toxoplasma gondii</i> e acompanhados durante 30 dias (bioensaio).....	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Porcentagem de sobrevivência acumulativa de camundongos Swiss, inoculados pela via intraperitoneal, com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 1 de *Toxoplasma gondii* e tratados pela via oral, 48 horas após a infecção, durante 10 dias com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), isoladas e em associação, e acompanhados até o 30° dpi.....27

Figura 2: Porcentagem de sobrevivência acumulativa de camundongos Swiss, inoculados pela via intraperitoneal, com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 25 de *Toxoplasma gondii* e tratados pela via oral, 48 horas após a infecção, durante 10 dias com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), isoladas e em associação, e acompanhados até o 30° dpi.....32

Figura 3: Porcentagem de sobrevivência acumulativa de camundongos Swiss, inoculados pela via intraperitoneal, com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 4 de *Toxoplasma gondii* e tratados pela via oral, 48 horas após a infecção, durante 10 dias com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), isoladas e em associação, e acompanhados até o 30° dpi.....37

Figura 4: Porcentagem de sobrevivência acumulativa de camundongos Swiss, inoculados pela via intraperitoneal, com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 17 de *Toxoplasma gondii* e tratados pela via oral, 48 horas após a infecção, durante 10 dias com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), isoladas e em associação, e acompanhados até o 30° dpi.....42

Figura 5: Porcentagem de sobrevivência acumulativa de camundongos Swiss, inoculados pela via intraperitoneal, com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 9 de *Toxoplasma gondii* e tratados pela via oral, 48 horas após a infecção, durante 10 dias com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), isoladas e em associação, e acompanhados até o 30° dpi.....47

Figura 6: Porcentagem de sobrevivência acumulativa de camundongos Swiss, inoculados pela via intraperitoneal, com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 13 de *Toxoplasma gondii* e tratados pela via oral, 48 horas após a infecção, durante 10 dias com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), isoladas e em associação, e acompanhados até o 30° dpi.....52

Figura 7: Porcentagem de sobrevivência acumulativa de camundongos Swiss, inoculados pela via intraperitoneal, com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 23 de *Toxoplasma gondii* e tratados pela via oral, 48 horas após a infecção, durante 10 dias com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), isoladas e em associação, e acompanhados até o 30° dpi.....57

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**AIDS** – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

**CEBIO** – Centro de Bioterismo

**CEUA** – Comitê de Ética no Uso de Animais

**DMSO** – dimetilsulfóxido

**Dpi** – Dias pós infecção

**ELISA** – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

**HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana

**ICB** – Instituto de Ciências Biológicas

**IP** – intraperitoneal

**kg** – quilogramas

**mg** – miligramas

**ml** –Mililitros

**µL** -microlitros

**µm** –Micrômetro

**nm**– nanômetros

**OPD** - o-phenylenediamine

**PABA** – Ácido Paraminobenzóico

**PBS** – Phospate buffered saline

**PBS-T** – Phospate buffered saline + Tween

**PCR** – Reação em cadeia da Polimerase

**PCR-RFLP** – Reação em cadeia da Polimerase Restriction Fragment Length Polymorphism

**pH** – potencial hidrogeniônico

**RIFI** – Reação de Imunofluorescência indireta

**TgCTBr** – *Toxoplasma gondii* Congenital Toxoplasmosis Brasil

**UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CLASSIFICAÇÃO, BIOLOGIA E CICLO DE VIDA

*Toxoplasma gondii* (Nicole e Manceaux, 1908) é um parasito intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, sendo a única espécie representante do gênero *Toxoplasma* e tendo capacidade de infectar virtualmente todos os tipos de aves e mamíferos, dentre eles o homem. Apresenta distribuição cosmopolita e possui alta prevalência mundial, tanto em humanos quanto animais, transformando esse parasito numa espécie de grande interesse médico e veterinário (Tenter *et al*, 2000).

*T. gondii* apresenta três estágios infecciosos, cada um deles apresentando características distintas e desempenhando diferentes papéis no ciclo de vida do parasito. Taquizoítos (Frenkel, 1973) são considerados os estágios mais comuns na fase aguda da toxoplasmose, na qual ocorre multiplicação assexuada do parasito. Morfologicamente, os taquizoítos apresentam um formato de “meia-lua”, com uma extremidade mais fina e outra arredondada, tamanho variando entre 2 e 6µm e um núcleo em posição central. Sua estrutura interna consiste de uma variedade de organelas como o anel apical, anel polar, conóide, roptrias, micronemas, mitocôndria, microtúbulos subpeliculares, retículos endoplasmáticos liso e rugoso, complexo de Golgi, ribossomas, e grânulos densos. Os taquizoítos não apresentam nenhuma estrutura de locomoção, tais como cílios ou flagelos, mas podem se movimentar por flexão, rotação ou ondulação de toda sua extensão (Dubey *et al*, 1998). Taquizoítos também são estágios responsáveis pela transmissão vertical (congênita) de *T. gondii*, uma vez que são capazes de infectar as células da placenta, se multiplicarem e, eventualmente, atingir a circulação fetal, causando assim a infecção do feto (Tenter *et al*, 2000). Em casos menos comuns, a

infecção por taquizoítos pode ocorrer através de procedimentos médicos como transplantes ou transfusões sanguíneas.

Bradizoítos, por sua vez, são os estágios encontrados no interior dos cistos teciduais, comumente observados na fase crônica da infecção. São células de multiplicação lenta, que se reproduzem por endodiogenia e podem ser encontradas até mesmo em infecções recentes, com cerca de 7 a 8 dias (Tenter *et al*, 2000), embora a visualização dos cistos nesse tempo de infecção seja bastante improvável, devido ao tamanho reduzido e baixa quantidade de cistos formados. Os bradizoítos contidos nos cistos teciduais são responsáveis pela infecção entre hospedeiros intermediários, geralmente causada pela ingestão desses cistos contidos na carne de mamíferos e aves, quando esta encontra-se crua ou mal passada. A concentração de cistos teciduais em diferentes tecidos pode apresentar variação de acordo com o hospedeiro analisado: em camundongos, a maior concentração de cistos ocorre geralmente no cérebro, ao passo que em mamíferos maiores, como ovinos e caprinos, essa concentração mais alta é encontrada no tecido muscular (Dubey *et al*, 1997).

Comparativamente, a morfologia de taquizoítos e bradizoítos é próxima, com a maior diferença sendo observada quanto a capacidade de infecção por via oral, sendo esta muito maior nos bradizoítos devido à resistência destes à digestão, enquanto os taquizoítos apresentam-se extremamente mais sensíveis (Frenkel *et al*, 1996; Gross *et al*, 1996). Entretanto existem alguns relatos confirmando a possibilidade de infecção oral pela ingestão de taquizoítos em camundongos, desde que em grandes quantidades (> 1000 taquizoítos) (Dubey *et al*, 1998).

Por fim, os esporozoítos são os estágios encontrados no interior dos oocistos, que são liberados em grandes quantidades, podendo chegar a milhões, apenas pelos hospedeiros definitivos, membros da família Felidae. Após a reprodução sexuada do

parasito, que ocorre no intestino dos felídeos, o oocisto liberado no ambiente passa por um processo de esporulação, tornando-se infectante em um período de cinco a sete dias e podendo permanecer viável no ambiente por até 18 meses em condições favoráveis (Dubey *et al*, 1998; Tenter *et al*, 2000).

O ciclo biológico do parasito é heteroxeno facultativo, sendo capaz de infectar animais de sangue quente através de diferentes vias, como oral (pela ingestão de cistos teciduais e/ou oocistos) e congênita. Essa capacidade de infecção por diferentes meios é um dos fatores que contribui para a grande prevalência e distribuição do *T. gondii* ao redor do mundo (Tenter *et al*, 2000).

Na fase inicial do ciclo de vida, os taquizoítos multiplicam-se assexuadamente por endodiogenia, nos mais variados tipos celulares do hospedeiro, e penetra, ativa ou passivamente, nas células hospedeiras. No interior da célula, contidos num vacúolo parasitóforo, os taquizoítos se multiplicam, até eventualmente romperem o vacúolo e a célula hospedeira e infectarem novas células (Sibley *et al*, 1999). Esse processo é característico da fase aguda da doença e é geralmente modulado pela resposta imune, a qual leva algumas gerações de taquizoítos a iniciarem a transformação para bradizoítos e a formação de cistos teciduais. Bradizoítos também se multiplicam no interior dos cistos, mas muito mais lentamente, caracterizando o estágio crônico da infecção que, para a maioria dos hospedeiros intermediários, é a fase final do ciclo.

No entanto, ao serem ingeridos por felídeos, os cistos teciduais podem dar continuidade ao ciclo biológico do parasito, realizando a reprodução sexuada no intestino desses animais. Ao ser ingerido, o cisto passa pelo estômago, onde tem a parede digerida pela ação do suco gástrico e, ao atingir o intestino delgado, os bradizoítos invadem enterócitos e após vários ciclos de esquizogonia, originam os merozoítos. Os merozoítos, por sua vez, se diferenciam em gametas masculinos e

femininos nos enterócitos dos felídeos. A fusão dos gametas (microgameta e macrogameta) resulta na formação do zigoto. Forma-se uma parede protetora ao redor do zigoto, que passa a ser denominado oocisto. Os oocistos são então liberados juntamente com as fezes, tornando-se infectantes no ambiente após alguns dias e podendo contaminar também água e alimentos que, ao serem ingeridos, levarão ao fechamento do ciclo nos hospedeiros intermediários ou à continuação do ciclo nos felídeos (Howe *et al*, 1995; Tenter *et al*, 2000).

## **1.2. DIVERSIDADE GENÉTICA DE *T. gondii***

Durante muito tempo existiu um consenso de que o *T. gondii* apresentava uma estrutura populacional clonal, com apenas três linhagens bem definidas: Tipo I, tipo II e tipo III. Esse fato foi descoberto através de trabalhos que, utilizando técnicas moleculares como a PCR-RFLP, concluíram que existiam variações muito pequenas entre isolados obtidos de humanos e dos mais diferentes hospedeiros de sangue quente (Howe & Sibley, 1995).

Essa descoberta foi inesperada, já que devido a possibilidade de reprodução sexuada, a grande distribuição mundial e a diversa gama de hospedeiros, esperava-se que houvesse grande variação entre isolados provenientes de diferentes fontes. Entretanto, existem argumentos que sustentavam a observação da clonalidade do *T. gondii*. Dentre esses argumentos, destacam-se os de que a reprodução sexuada ocorre apenas no epitélio intestinal dos felinos (Howe *et al*, 1995), ao passo que a reprodução assexuada pode ocorrer em qualquer hospedeiro e é capaz de manter o parasito infectante e circulando no ambiente sem necessidade do hospedeiro definitivo (Tenter *et al*, 2000).

A partir de 2006, novas descobertas alteraram os conceitos da genética populacional de *T. gondii*. A partir da utilização de novos e mais numerosos marcadores genéticos propostos por Su *et al* (2006) para a realização de PCR-RFLP, começaram a ser encontradas novas linhagens, que foram denominadas atípicas (ou recombinantes), em diversas regiões, principalmente na América Latina e, conseqüentemente no Brasil. Atualmente, é aceito que as cepas tipos I, II e III, de estrutura clonal, circulam comumente no hemisfério Norte, especialmente na Europa e Estados Unidos, onde foram realizados os trabalhos iniciais para caracterização genética do *T. gondii*. Por outro lado, no hemisfério Sul, principalmente na América Latina, os isolados encontrados são, em sua larga maioria, pertencentes a genótipos atípicos, contendo alelos de duas ou mais das populações clonais. Acredita-se, no entanto, que as linhagens presentes especialmente no Brasil sejam predominantemente derivadas dos tipos clonais I e III (Pena *et al*, 2008), já que a maior parte dos trabalhos foi incapaz de isolar amostras do tipo II no país. Estudos realizados por diversos pesquisadores (Dubey *et al*, 2007; Pena *et al*, 2008; Dubey *et al*, 2012), utilizando os 11 marcadores genéticos propostos por Su *et al* (2006) comprovaram essa grande diversidade de isolados em diferentes hospedeiros, principalmente animais domésticos, de diferentes regiões do Brasil. Os dados desses trabalhos levaram a hipótese de que o Brasil possui suas próprias linhagens clonais, genótipos distintos dos europeus/americanos, mas que possuem grande circulação dentro do país em uma diversidade de hospedeiros, sendo denominados BrI, BrII, BrIII e BrIV. Esses genótipos, isolados de diferentes hospedeiros (gatos, galinhas e cães) apresentam características diferentes entre si, variando de altamente virulentos (BrI), não virulentos (BrIII) e de virulência intermediária (BrII e BrIV), sendo considerados para os testes de virulência apenas camundongos. O estudo realizado por Pena *et al* (2008), ao combinar dados encontrados

no isolamento e genotipagem de 46 amostras de gatos provenientes do estado de São Paulo com dados previamente publicados, concluiu que esses quatro genótipos são altamente frequentes em hospedeiros animais, sendo coexistentes com uma diversa extensão de outros genótipos, mas apresentando maior frequência na análise de todas as regiões.

Ainda assim, em trabalho recente publicado por Carneiro *et al* (2013), realizado com isolados obtidos de crianças com toxoplasmose congênita, foram encontrados vários genótipos previamente desconhecidos, além dos genótipos BrII e BrIII, o que leva a crer que o tamanho e o significado da diversidade de *T. gondii* no Brasil é ainda uma questão a ser respondida.

Um grande volume de dados que ilustra a variedade genotípica de *T. gondii* encontra-se disponível no ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>), um banco de dados que armazena diferentes genótipos isolados de diversas regiões do mundo, permitindo que pesquisadores possam comparar e analisar genótipos previamente encontrados, evitando que ocorram diversas descrições de um mesmo genótipo como se fossem genótipos distintos, além de manter disponível uma base de informações de fácil acesso para pesquisadores.

### **1.3. TOXOPLASMOSE: DOENÇA X INFECÇÃO**

Embora seja uma infecção altamente prevalente, com cerca de 30% da população mundial afetada, a toxoplasmose é, comumente, assintomática, sendo de importância clínica apenas em pacientes imunodeficientes, como fetos, recém nascidos, indivíduos transplantados e portadores do vírus HIV (Tenter *et al*, 2000). Para esses grupos de risco, portanto, a toxoplasmose é de grande importância, pois pode acarretar

em grave sintomatologia, como encefalite, pneumonite, miocardite e retinocoroidite, ocasionadas por doença disseminada. (Sibley *et al*, 1999)

Atualmente, existe interesse especial acerca da toxoplasmose congênita, que pode acarretar em complicações graves para o feto de acordo com o estágio da gravidez no qual a doença é transmitida. A sintomatologia e a gravidade da doença variam de acordo com a idade gestacional na qual ocorre a transmissão, sendo de extrema importância o maior controle nas fases iniciais da gestação, nas quais ocorrem sequelas mais graves e existe possibilidade de aborto. À medida que a gestação evolui, a possibilidade de transmissão geralmente aumenta, ao passo que a gravidade da doença torna-se menor, levando a sintomas mais brandos e sequelas menos graves. Tais consequências podem variar entre calcificações cerebrais, deficiências neurológicas, problemas auditivos e, mais frequentemente, em problemas oculares decorrentes de retinocoroidite, condição que ocorre com grande frequência no Brasil – até 80% (Vasconcelos-Santos *et al*, 2009) – quando comparado com Europa e Estados Unidos. É importante ressaltar que geralmente as lesões decorrentes de retinocoroidite no Brasil são também mais graves do que aquelas observadas na Europa e Estados Unidos (Gilbert *et al*, 2008).

O grande índice de lesões oculares e as consequências decorrentes geram um interesse na prevenção e tratamento da toxoplasmose aguda, com a combinação de Sulfadiazina e Pirimetamina sendo a associação mais adotada atualmente para combate da doença.

#### **1.4. QUIMIOTERAPIA DA TOXOPLASMOSE**

Atualmente, o esquema mais utilizado para o tratamento da toxoplasmose é a combinação de Sulfadiazina e Pirimetamina (Petersen, 2007). A Sulfadiazina (2-sulfamilamidopirimidina) é um análogo estrutural do ácido paraminobenzóico (PABA) e atua como antagonista competitivo do mesmo, impedindo a sua utilização para a síntese do ácido fólico por parte do parasito. A Sulfadiazina é administrada pela via oral, sendo rapidamente absorvida pelo estômago e intestino delgado, com ampla distribuição nos tecidos e líquidos corporais, incluindo sistema nervoso central e líquido cefalorraquidiano, além de placenta e feto. Já foram realizados diversos estudos com outros tipos de sulfonamidas, com o intuito de se encontrar alternativas que possam complementar ou substituir o uso da Sulfadiazina, principalmente em casos nos quais o tratamento não atinge resultados satisfatórios. Zeng *et al* (2013) testaram outras sulfonamidas (Sulfadimidina, Sulfamatoxidiazina, Sulfacloropirazina), em comparação à Sulfadiazina, com objetivo de apresentar substitutos em casos nos quais o tratamento mostra-se pouco eficiente, e propondo alternativas que podem ser aplicadas em casos como os citados.

Já a Pirimetamina atua inibindo a enzima diidrofolato-redutase, impedindo a conversão do ácido diidrofólico em ácido tetraidrofólico, processo que participa da via de síntese dos ácidos nucleicos do parasito, o que ocasiona erros na divisão nuclear durante a replicação do parasito (Bosch-Driessen *et al*, 2002). Efeitos da Pirimetamina sobre o parasito incluem diversas alterações morfológicas, como alterações de membrana, duplicação de organelas e fragmentação do núcleo, que leva a incapacidade do parasito completar sua divisão com sucesso. A Pirimetamina, assim como a Sulfadiazina, inibe a replicação do parasito ao invés de matá-lo, tendo dessa forma, uma ação parasitostática e não parasiticida (Bosch-Driessen *et al*, 2002). Como as sulfonamidas e a Pirimetamina interferem em estágios diferentes no ciclo de síntese do

ácido folínico, suas ações são acentuadas, apresentando efeito sinérgico, o que torna esta combinação o tratamento de escolha para a toxoplasmose humana, por permitir um bloqueio sequencial do metabolismo do ácido fólico (Leport et al, 1988). Essa reação ocorre tanto em células de mamíferos quanto de protozoários. Embora exista uma pequena homologia entre essa enzima (dhfr) em ambos os tipos celulares, a dhfr do parasito apresenta maior afinidade para a pirimetamina do que a dhfr dos hospedeiros, resultando em toxicidade muito maior para o parasito (Gross & Pohl, 1996). No entanto, esta combinação é caracterizada por severos efeitos colaterais, contribuindo para a descontinuação do tratamento de aproximadamente 25% dos pacientes (Bosch-Driessen *et al*, 2002).

Sabe-se que a Pirimetamina, embora tenha ação mais lenta no organismo quando comparada com outras drogas utilizadas no tratamento para toxoplasmose (azitromicina e clindamicina, p. ex.), é totalmente absorvida pelo organismo quando administrada por via oral. O tratamento prolongado com Pirimetamina pode resultar em depressão da medula óssea, um efeito colateral de particular importância em indivíduos imunocomprometidos. Os efeitos colaterais das sulfonamidas devem-se em parte à alergia e em parte à toxicidade direta do medicamento, que contribuem para a ocorrência de “rash” cutâneo, febre, além de depressão da medula óssea e mal-estar. Quando a Pirimetamina é administrada em associação com a Sulfadiazina, os efeitos colaterais são suficientemente severos para requerer a descontinuidade do tratamento, em aproximadamente 60% dos pacientes com AIDS (Araújo et al, 1991). Além disso, como a Pirimetamina é potencialmente teratogênica, seu uso durante a gestação não é recomendado (Araújo et al, 1991). Embora existam estudos mostrando redução no número de cistos teciduais no cérebro de camundongos cronicamente infectados e tratados (Gill *et al*, 1972; Werner *et al*, 1977), o consenso adotado de forma geral é de

que tanto a Sulfadiazina quanto a Pirimetamina apresentam ação reduzida sobre os cistos teciduais, fator que contribui para a manutenção da fase crônica da doença.

Embora os dados mostrem efetividade do tratamento combinado de Sulfadiazina e Pirimetamina, especialmente em períodos mais curtos, não existe uma orientação que padronize o tratamento. Por isso, diversos estudos (Romand *et al*, 1993; Bosch-Driessen *et al*, 2002; Alves & Vítor, 2005; Vommaro *et al*, 2012) avaliam a ação das mais variadas drogas e combinações de medicamentos no combate da toxoplasmose, com o objetivo de encontrar alternativas mais efetivas e que apresentem menor toxicidade aos pacientes, especialmente em regimes de tratamento prolongado, além de apresentar opções para casos em que a resposta ao tratamento não seja satisfatória.

Um estudo realizado por Aspinall *et al* (2002) encontrou, ao analisar casos de toxoplasmose aguda humana, uma cepa de *T. gondii* resistente a ação de sulfonamidas, devido a apenas um aminoácido polimórfico associado a enzima diidropteroatosintase, evidenciando a existência de linhagens resistentes de *T. gondii* causando infecções humanas, reforçando a perspectiva de que é interessante personalizar os esquemas terapêuticos de acordo com o tipo de caso dos pacientes.

Diversos estudos buscaram alternativas às drogas utilizadas normalmente, como Araújo *et al.*, 1991; Huskinson-Mark *et al.*, 1991; Araújo *et al.*, 1993; Romand *et al.*, 1993 e, mais tarde, Alves & Vítor, 2005, que tiveram como alvo de estudo a Atovaquona. Estes autores demonstraram a efetividade da Atovaquona contra taquizoítos e cistos teciduais do *T. gondii* em protocolos individuais de tratamento ou em associação com outros medicamentos, inclusive com a Sulfadiazina. No entanto, o fato desse medicamento ainda ser de circulação restrita no Brasil e, conseqüentemente, de alto custo, impedem sua utilização como alternativa viável à Pirimetamina e Sulfadiazina. No entanto, trabalhos como os realizados por Ferreira *et al* (2006; 2012),

nos quais foram estudadas outras substâncias classificadas naftoquinonas (mesmo grupo da atovaquona), foi relatada a eficácia desses compostos, denominados QUI11 e PHNQ6, no tratamento contra a toxoplasmose, evidenciando a existência de drogas com potencial de desenvolvimento para tratamento da doença.

Diversas outras drogas, como a Clindamicina (Djurkovic-Djakovic *et al*, 2002), Gatifloxacina (Khan *et al*, 2001) e Fluconazol (Martins-Duarte *et al*, 2012) já foram testadas isoladamente e em diversas combinações, tanto com a Sulfadiazina quanto com a Pirimetamina, buscando outras associações que se aproximem da eficiência do tratamento de rotina, não sendo bem sucedidas, no entanto, a ponto de constituírem protocolos mais atraentes como esquemas terapêuticos alternativos.

### **1.5. TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *T. GONDII* A QUIMIOTERAPIA**

Para se avaliar a efetividade de esquemas terapêuticos, Djurkovic-Djakovic *et al*, em 1999, propuseram, em um estudo sobre a eficácia do tratamento da toxoplasmose murina utilizando atovaquona e clindamicina, diferentes métodos diagnósticos do parasito. Esses métodos baseiam-se principalmente na comparação da taxa de sobrevivência de camundongos infectados, tratados e não tratados. Em relação aos animais sobreviventes, utilizaram o bioensaio, que consiste de um subinóculo com material proveniente de animais sobreviventes, previamente infectados e tratados, com o intuito de se reisolar o parasito, além de realização de reação em cadeia de polimerase (PCR) em diferentes tecidos em busca de DNA de *T. gondii*.

Mais tarde, Djurkovic-Djakovic *et al* (2002) utilizaram, como método auxiliar de avaliação, a quantidade de cistos presentes no cérebro de animais previamente infectados e submetidos a diferentes esquemas terapêuticos, além de, em

casos nos quais a procura de cistos obtivesse resultado negativo, a realização de bioensaio, através do subinóculo do cérebro em animais saudáveis.

Em 2005, Alves & Vítor, ao avaliarem a eficácia do tratamento da toxoplasmose murina utilizando atovaquona e sulfadiazina, isoladas e em associação, em sete cepas de genótipos distintos de *T. gondii*, se utilizaram de exames sorológicos (ELISA) para confirmação de infecção, detecção de cistos cerebrais e também bioensaio, além das taxas de sobrevivência, como métodos para avaliar a eficácia dos esquemas terapêuticos propostos.

Estudos realizados *in vitro*, como o de Meneceur *et al* (2008), que avaliaram a susceptibilidade de diferentes cepas de *T. gondii* ao tratamento com Sulfadiazina, Pirimetamina e Atovaquona, utilizaram reações sorológicas, como o ELISA, e também a visualização microscópica do parasito nas placas de cultura como métodos de avaliação de eficácia dos esquemas terapêuticos.

## 2. JUSTIFICATIVA

O principal tratamento adotado atualmente para a toxoplasmose é a combinação de sulfonamidas (como a Sulfadiazina) e a Pirimetamina. Não é conhecida, no entanto, qual a eficácia deste tratamento em relação a cepas atípicas de *T. gondii*, predominantes no Brasil e geneticamente distintas dos genótipos clonais comuns no hemisfério Norte. É possível que, devido à grande variedade de genótipos do parasito encontrada no Brasil, a eficácia do tratamento ocorra de maneira particular para cada cepa, ou para determinados grupos de genótipos. Uma avaliação mais adequada acerca da eficácia do tratamento tradicionalmente utilizado, principalmente utilizando cepas isoladas de casos humanos, poderia indicar protocolos para escolha de programas mais eficientes de tratamento para grupos de pacientes com respostas distintas, utilizando dosagens de drogas que se ajustem a tolerância do paciente e apresentem eficácia no combate ao parasito, sem que haja grandes ocorrências de efeitos adversos.

É conhecido também o efeito tóxico que pode ocorrer em alguns casos de tratamento, podendo levar a suspensão temporária e até mesmo à interrupção da terapia. A avaliação da combinação de drogas em dosagem menor pode levar a um indicativo para reformulação dos protocolos de tratamento em casos específicos, onde a tolerância do paciente aos medicamentos seja menor e onde a maior susceptibilidade do parasito exigiria menores doses de medicamento.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a suscetibilidade de *T. gondii* isolado no Brasil à Sulfadiazina e à Pirimetamina, em diferentes protocolos individuais e em associação, no tratamento de camundongos infectados com cepas atípicas do parasito obtidas de humanos com toxoplasmose congênita.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.2.1: Avaliar *in vivo* a suscetibilidade de cepas de *T. gondii* à diferentes doses de Sulfadiazina.

3.2.2: Avaliar *in vivo* a suscetibilidade de cepas de *T. gondii* à diferentes doses de Pirimetamina.

3.2.3: Avaliar *in vivo* a suscetibilidade de cepas de *T. gondii* à uma associação de baixas dosagens de Pirimetamina e Sulfadiazina.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. ANIMAIS**

Para realização deste trabalho, foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, com idade entre quatro e seis semanas de vida e peso médio em torno de 25 gramas. Todos os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG. Para infecção experimental com cada uma das sete cepas de *T. gondii*, camundongos foram divididos em dez grupos, contendo sete ou oito animais cada. Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, certificado pelo protocolo 257/2012 (Anexo).

### **4.2. PARASITOS**

Foram avaliadas sete cepas, isoladas de pacientes humanos recém nascidos com toxoplasmose congênita, genotipicamente caracterizadas como atípicas e classificadas como virulentas para camundongos, denominadas TgCTBr1 (#206), TgCTBr4 (#108), TgCTBr9 (#11), TgCTBr13 (#208), TgCTBr17 (#108), TgCTBr23 (#41) e TgCTBr25 (#206) (Carneiro *et al*, 2013). Os números entre parênteses correspondem ao genótipo de cada cepa segundo o banco de dados Toxo DB (<http://toxodb.org/toxo/>), sendo o genótipo #11 correspondente ao clonal brasileiro BrII, os genótipos #41 e #108 correspondentes a genótipos previamente isolados e os genótipos #206 e #208 correspondentes a novos genótipos nunca descritos anteriormente. No quadro 1 (adaptado de Carneiro *et al*, 2013) encontram-se informações sobre cada uma das sete cepas utilizadas neste trabalho, segundo Carneiro *et al* (2013).

**Quadro 01.** Genótipos de cepas de *Toxoplasma gondii* utilizados neste estudo, com a mesorregião de origem do isolamento, apresentação clínica no recém nascido e virulência em camundongos (adaptado de Carneiro et al, 2013).

CEPA	MESORREGIÃO DE	LESÃO	DÉFICIT	CALCIFICAÇÕES	VIRULÊNCIA	GENÓTIPO
	MINAS GERAIS	OFTALMOLÓGICA	AUDITIVO	CEREBRAIS		
<b>TgCTBr 01</b>	Zona da Mata	RC	-	-	Virulenta	#206
<b>TgCTBr 04</b>	Central Mineira	RAC	-	-	Virulenta	#108
<b>TgCTBr 09</b>	Vale do Rio Doce	RAC	NR	+	Virulenta	#11 (BrII)
<b>TgCTBr 13</b>	Sul/ Sudoeste de Minas	SL	NR	-	Virulenta	#208
<b>TgCTBr 17</b>	Zona da Mata	RAC	NR	-	Virulenta	#108
<b>TgCTBr 23</b>	Norte de Minas	RAC	+	-	Virulenta	#41
<b>TgCTBr 25</b>	Zona da Mata	RAC	NR	-	Virulenta	#206

SL – sem lesão oftalmológica, RC - com lesão cicatrizada na retina, RAC - retinocoroidite com lesão ativa e cicatrizada, +: presente; -: ausente; NR: não realizado

### 4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Taquizoítos das cepas anteriormente citadas (quadro 1), mantidas criopreservadas em solução tampão fosfato PBS pH 7,2 estéril com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), foram descongeladas e, após lavagem por centrifugação, inoculadas via intraperitoneal (IP) em dois ou três camundongos. Partiu-se do material criopreservado com o objetivo de utilizar parasitos que tivessem apresentado menor número de passagens por animais, tendo portanto menor contato prévio com as drogas utilizadas para o tratamento dos grupos experimentais. Os camundongos foram acompanhados até que ocorresse a morte, caso no qual foi feita a lavagem do peritônio, para pesquisa de taquizoítos, e pesquisa de cistos cerebrais, com subsequente passagem do material infectante para um novo animal, ou até que ocorresse cronificação da doença para a obtenção de cistos cerebrais suficientes para realização do experimento.

Cerca de 30 dias após a infecção (dpi) e confirmação sorológica através de ELISA, os animais foram sacrificados para retirada do cérebro. O cérebro foi macerado a seco, seguido da adição de 1ml de PBS, formando uma suspensão a partir da qual foram preparadas 2 lamínulas contendo 10 microlitros cada. As duas lamínulas foram visualizadas em microscópio óptico para contagem do número de cistos teciduais.

Os cistos obtidos foram então inoculados em cinco a sete camundongos, cada um recebendo de 250 a 500 cistos através de inóculo via IP. Após 5 a 7 dias, os animais infectados foram sacrificados e feita a lavagem do peritônio para obtenção dos taquizoítos. O lavado peritoneal foi centrifugado a 1500g durante 15 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento, com os parasitos, foi então ressuspensionado em 2ml de PBS e filtrado em membrana de policarbonato (Millipore) com porosidade de 3 $\mu$ m (Ferreira *et al.*, 2001). Os taquizoítos presentes no filtrado foram contados em

câmara hematocitométrica, e diluídos para a concentração de  $10^4$  taquizoítos/200 $\mu$ l em PBS. Cada isolado foi inoculado pela via IP, 200 microlitros por camundongo, de acordo com os grupos experimentais descritos a seguir.

#### **4.4. PREPARO DOS MEDICAMENTOS**

As suspensões de Sulfadiazina (Laboratório Catarinense, Brasil) e Pirimetamina (Daraprim, FQM) foram preparadas em carboximetilcelulose 0,25% dissolvida em água destilada (Khan *et al*, 1997; Alves & Vítor, 2005) da seguinte forma:

Os comprimidos (500mg de sulfadiazina e 25mg de pirimetamina) foram macerados e dissolvidos em carboximetilcelulose 0,25%, de forma a se obter a maior concentração utilizada nos experimentos (640mg/kg para Sulfadiazina e 200mg/kg para Pirimetamina, respectivamente). A partir dessas concentrações, foram preparadas diluições seriadas na proporção 1:4. O volume administrado diariamente por via oral foi de 100 microlitros, com utilização de sonda de alimentação.

Para preparo da suspensão combinada de SDZ + PM, foi feita uma mistura 1:1 das suspensões de concentração 40mg/kg (SDZ) e 12,5mg/kg (PM) e posteriormente uma diluição 1:2, obtendo-se dessa maneira as concentrações necessárias sem que haja necessidade de aumento do volume inoculado.

#### **4.5. GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Após 48 horas do início da infecção, para minimizar a possibilidade de eliminação total dos parasitos antes do pleno estabelecimento da infecção, os animais

foram tratados, por via oral, uma vez por dia (Djurkovic-Djakovic *et al*, 1999; Alves & Vítor, 2005), da seguinte forma:

**Grupo Controle:** Animais infectados, tratados apenas com o diluente dos medicamentos.

**Grupo SDZ10:** Animais infectados, tratados com Sulfadiazina, a uma concentração de 10mg/kg por dia.

**Grupo SDZ40:** Animais infectados, tratados com Sulfadiazina, a uma concentração de 40mg/kg por dia.

**Grupo SDZ160:** Animais infectados, tratados com Sulfadiazina, a uma concentração de 160mg/kg por dia.

**Grupo SDZ640:** Animais infectados, tratados com Sulfadiazina, a uma concentração de 640mg/kg por dia.

**Grupo PM3:** Animais infectados, tratados com Pirimetamina, a uma concentração de 3,13mg/kg por dia.

**Grupo PM12:** Animais infectados, tratados com Pirimetamina, a uma concentração de 12,5mg/kg por dia.

**Grupo PM50:** Animais infectados, tratados com Pirimetamina, a uma concentração de 50mg/kg por dia.

**Grupo PM200:** Animais infectados, tratados com Pirimetamina, a uma concentração de 200mg/kg por dia.

**Grupo SDZ + PM:** Animais tratados simultaneamente com Sulfadiazina e Pirimetamina, a uma concentração de 10mg/kg + 3,13 mg/kg por dia, respectivamente.

O tratamento foi iniciado no 2º dpi, e teve curso contínuo de 10 dias, sendo interrompido no 12º dpi. Os grupos foram acompanhados até o 30º dpi, com a mortalidade sendo registrada diariamente durante este período.

A escolha das dosagens e tempo de tratamento utilizados no experimento baseou-se em relatos da literatura, bem como no objetivo de se testar um espectro amplo de tratamento, visando uma melhor comparação dos resultados (Derouin *et al*, 1992; Khan *et al*, 1997; Alves & Vítor, 2005; Meneceur, *et al* 2008). Em um experimento prévio, camundongos não infectados foram tratados com as dosagens dos medicamentos descritos anteriormente com o objetivo de avaliar a toxicidade dos mesmos.

#### **4.6. ACOMPANHAMENTO DOS CAMUNDONGOS**

Durante 30 dpi, os animais foram acompanhados e tiveram a mortalidade registrada diariamente para análise de sobrevivência. Ao final deste período, os animais sobreviventes foram avaliados para a eficácia dos esquemas terapêuticos, segundo critérios estabelecidos previamente (Alves & Vítor, 2005). Todos os sobreviventes tiveram o sangue coletado para realização de exame sorológico confirmatório para toxoplasmose (ELISA), sendo posteriormente sacrificados por deslocamento cervical e submetidos a pesquisa de cistos cerebrais. Nos animais cuja pesquisa de cistos apresentou resultados negativos, foi realizado bioensaio, através do inóculo intraperitoneal do macerado cerebral em um novo camundongo saudável, que foi acompanhado durante 30 dias e, posteriormente, submetido à análise sorológica e pesquisa de cistos no cérebro.

##### **4.6.1. ELISA**

A pesquisa de anticorpos IgG através de ELISA foi realizada segundo o protocolo descrito a seguir, de acordo com Brandão *et al.* (2009).

Microplacas de poliestireno, contendo 96 wells foram sensibilizadas com antígeno obtido de taquizoítos da cepa RH do *T. gondii* sonicados, após sua diluição em tampão carbonato pH 9,6 a uma concentração de 5µg/ml. Um volume de 100µl deste antígeno foi colocado em cada orifício das placas, que foram incubadas por 18h a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas quatro vezes com solução de lavagem (NaCl 9g/L, Tween 20 0,05% em água destilada).

Em seguida, as placas foram bloqueadas utilizando solução de Caseína 0,25% (em PBS Tween 20 a 0,05% - PBS-T) durante 30 minutos. Após isso, as placas foram lavadas duas vezes utilizando solução de lavagem e foram adicionados 100µl de eluato de sangue em papel filtro, coletado pela cauda dos animais. Um picote de 0,5 mm de papel filtro com sangue seco foi eluído *overnight* em 0,5 ml de PBS a 4° C, resultando em uma diluição de aproximadamente 1:100. Foram incluídos em cada placa dois eluatos controle positivos e seis eluatos negativos, previamente testados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). As placas foram incubadas a 37°C durante 45 minutos.

Transcorrido este período, as placas foram lavadas novamente quatro vezes, com solução de lavagem. Em seguida, 100µl do conjugado anti-IgG de camundongo, marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo, USA) e diluído 1:5000 em PBS-T foram adicionados por orifício e incubados a 37°C por 45 minutos. Novamente, foram feitas quatro lavagens, adicionando-se em seguida, 100µl do substrato enzimático por orifício. O substrato é constituído por água oxigenada a 0,03% e 2 mg de OPD (orthophenylenediamine), diluídos em 10 ml de tampão citrato-fosfato

pH 5,0 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3,6g/500 ml; ácido cítrico, 2,6g/500ml em água destilada). Após a adição do substrato, as placas foram incubadas por 20 minutos em câmara escura a 37°C. A reação enzimática foi interrompida adicionando-se 30 $\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 4N por orifício, e a densidade ótica determinada para cada orifício das placas em leitor de ELISA (BIORAD modelo 3550) com filtro de 490 nm. Amostras com valores em absorbância maiores que o *cut off* foram consideradas positivas. O *cut off* foi calculado pela média de absorbância de seis animais negativos mais três desvios-padrão.

#### **4.6.2. PESQUISA DE CISTOS**

Depois de decorrido o período de 30 dpi e realização da pesquisa de anticorpos IgG por ELISA, os animais sobreviventes foram sacrificados por deslocamento cervical para retirada do cérebro. O cérebro foi dividido em duas metades, sendo o hemisfério direito macerado a seco e depois adicionado 0,5ml de PBS pH 7,2 estéril, formando uma suspensão a partir da qual foram preparadas 2 lamínulas contendo 10 microlitros cada. As duas lamínulas foram visualizadas em microscópio óptico para contagem do número de cistos teciduais, sendo considerada a média da contagem obtida nas duas lamínulas. O hemisfério esquerdo do cérebro foi congelado e estocado para realização de experimentos futuros.

#### **4.6.3. BIOENSAIO**

Em caso de resultado negativo na pesquisa de cistos, a suspensão de cérebro era homogeneizada novamente e subinoculada pela via IP em um novo camundongo Swiss saudável, que era acompanhado por um período de 30 dias. Em caso de morte decorrente de sintomas compatíveis com toxoplasmose, o resultado do bioensaio foi

considerado positivo. Em caso de animais sobreviventes, estes eram sacrificados no 30º dia e submetidos a teste sorológico (ELISA) e pesquisa de cistos cerebrais de acordo com as metodologias já citadas para confirmação de resultado negativo no bioensaio.

#### **4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise de sobrevivência e construção das curvas de sobrevivência foi realizada através do teste de log-rank (Mantel-Cox). Diferenças no número de cistos cerebrais foram avaliadas utilizando análises não paramétricas com o teste de Kruskal-Wallis pareado com Dunns. Os resultados foram considerados significativos quando os valores de p encontrados foram inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Todos os procedimentos relacionados à construção das curvas e análises estatísticas foram realizados utilizando o software GraphPadPrism versão 5.0.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE DIFERENTES DOSAGENS DE SULFADIAZINA E PIRIMETAMINA PARA CAMUNDONGOS**

Os animais utilizados para avaliação da toxicidade das diferentes dosagens de Sulfadiazina apresentaram 100% de sobrevivência para todos os grupos, comprovando a segurança de uso das dosagens selecionadas por não terem causado a morte de animais saudáveis. Para a Pirimetamina, os grupos submetidos a tratamento com dosagens de 3,13, 12,5 e 50 mg apresentaram 100% de sobrevivência. No entanto, a dosagem de 200mg de Pirimetamina mostrou-se letal para todos os camundongos no 1º dia de tratamento. Camundongos tratados com a combinação de SDZ + PM apresentaram 100% de sobrevivência, mostrando-se viável para utilização nos experimentos.

Devido à alta letalidade da dosagem diária de 200mg de Pirimetamina, optou-se pela não utilização desta dosagem para o tratamento de camundongos experimentalmente infectados com *T. gondii*, diminuindo o total de grupos experimentais de dez para nove.

## **5.2. TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM A CEPA TgCTBr 1 (#206) UTILIZANDO SULFADIAZINA E PIRIMETAMINA, ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO**

As porcentagens de sobrevivência dos camundongos infectados com a cepa TgCTBr 1 e submetidos a diferentes tratamentos com Sulfadiazina e Pirimetamina foram representadas na figura 1. Todos os animais do grupo controle não tratado morreram até o 8º dia de infecção.

Os grupos de animais tratados com diferentes dosagens de Sulfadiazina apresentaram diferenças significativas nas taxas de sobrevivência no 30º dpi, sendo que apenas o grupo SDZ10 não mostrou diferença estatística quando comparado ao grupo controle não tratado. Quando comparados entre si, o grupo SDZ10, que apresentou 0% de sobrevivência, foi significativamente diferente dos grupos SDZ160 e SDZ640, que apresentaram, respectivamente, 75% e 62,5% de sobrevivência, evidenciando que as dosagens maiores de Sulfadiazina foram efetivas em impedir a mortalidade da maior parte dos animais. Por sua vez, o grupo SDZ40 (12,5% de sobrevivência) também apresentou diferenças significativas em relação aos grupos SDZ160 e SDZ640, reforçando a observação de que as dosagens mais baixas são menos eficientes em prolongar a sobrevivência dos camundongos. Com relação às dosagens mais altas, não houve diferença estatística entre os grupos SDZ160 e SDZ640.

Para os animais tratados com Pirimetamina, houve diferença significativa entre o grupo controle não tratado e todos os grupos tratados, inclusive PM3, que, embora tenha atingido 100% de mortalidade, apresentou uma sobrevida maior em relação ao grupo controle. O grupo PM50, único a atingir 100% de sobrevivência, apresentou resultados

significativos quando comparado com PM3, embora o mesmo não tenha ocorrido quando comparado com PM12 (75% de sobrevivência).

É importante ressaltar que, embora as dosagens administradas aos grupos SDZ10 e PM3 não tenham sido eficazes em prevenir a mortalidade, o grupo SDZ + PM atingiu 87,5% de sobrevivência, sugerindo que, ao serem associadas, as duas drogas adquirem um efeito sinérgico que garante maior eficácia no combate ao parasito.

Todos os camundongos sobreviventes apresentaram sorologia positiva para *T. gondii* após a realização de ELISA, comprovando o sucesso da infecção experimental.

Em relação à análise de cistos, 25 dos 32 camundongos sobreviventes apresentavam cistos cerebrais. Não foi possível realizar análise estatística do número de cistos cerebrais, devido ao tamanho reduzido da amostra (poucos camundongos sobreviventes) e também ao alto desvio padrão encontrado (Tabela 1).

O bioensaio foi realizado para um total de sete amostras, sendo os resultados representados na Tabela 2. Todos os sete animais apresentaram resultado negativo, indicando a ausência de parasitos no cérebro dos camundongos inicialmente tratados.

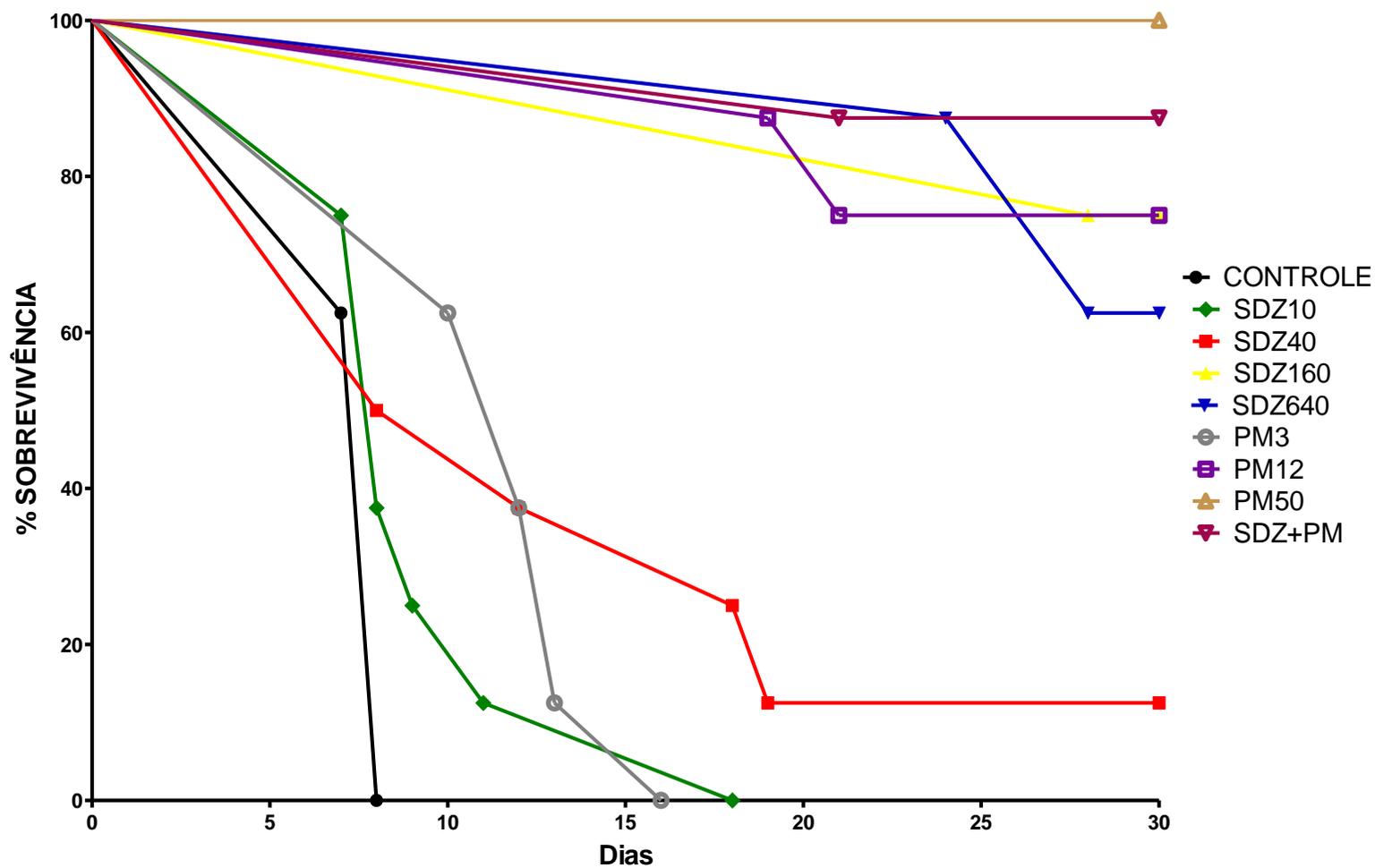


Figura 1: Porcentagem de sobrevivência acumulativa de camundongos Swiss, inoculados pela via intraperitoneal com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 1 de *Toxoplasma gondii* e tratados pela via oral, 48 horas após a infecção, durante 10 dias com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), isoladas e em associação, e acompanhados até o 30º dpi.

Tabela 1: Sobrevivência e número médio de cistos cerebrais em camundongos inoculados com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 1 de *Toxoplasma gondii* e tratados com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), 48 horas após a infecção, durante 10 dias e acompanhados durante 30 dias.

CEPA TgCTBr 1 (genótipo #206)		
Medicamentos	Sobreviventes/ Total	Média $\pm$ desvio padrão do N° de cistos
Controle não tratado	0/8	-
SDZ10	0/8	-
SDZ40	1/8	12.100
SDZ160	6/8	3.000 $\pm$ 955
SDZ640	5/8	840 $\pm$ 594,1
PM3	0/8	-
PM12	6/8	423,3 $\pm$ 373,2
PM50	7/7	342,9 $\pm$ 907,1
SDZ 10 + PM 3	7/8	671,4 $\pm$ 607,5

Tabela 2: Presença de cistos cerebrais e resultado sorológico de camundongos subinoculados via i.p. com cérebros de camundongos previamente infectados com a cepa TgCTBr 1 de *Toxoplasma gondii* e acompanhados durante 30 dias (bioensaio).

<b>CEPA TgCTBr1 (genótipo #206) – BIOENSAIO</b>			
<b>MEDICAMENTOS</b>	<b>TOTAL DE BIOENSAIOS</b>	<b>CISTOS CEREBRAIS</b>	<b>ELISA</b>
		<b>Positivos/Negativos</b>	<b>Sobreviventes/Positivos</b>
PM50	6	0/6	6/0
SDZ10 + PM3	1	0/1	1/0

### **5.3. TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM A CEPA TgCTBr 25 (#206) UTILIZANDO SULFADIAZINA E PIRIMETAMINA, ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO**

As porcentagens de sobrevivência dos camundongos infectados com a cepa TgCTBr 25 e submetidos a diferentes tratamentos com Sulfadiazina e Pirimetamina foram representadas na figura 2.

Na análise dos resultados obtidos para o tratamento de camundongos infectados com taquizoítos da cepa TgCTBr 25, houve diferença significativa entre o grupo controle não tratado e todos os demais grupos experimentais, evidenciando a importância do tratamento em cepas virulentas, mesmo que em dosagens reduzidas. Todos os animais do grupo controle, não tratado, morreram até o 11º dia de infecção.

A mortalidade nos grupos SDZ10, SDZ160 e SDZ640, por sua vez, não apresentaram quaisquer diferenças significativas entre si. O grupo SDZ40, por sua vez, foi o único tratado com SDZ a apresentar 100% de sobrevivência e, embora essa diferença tenha sido significativa do ponto de vista estatístico, os resultados mostram perfis similares para todos os grupos de tratamento com SDZ.

Observando os grupos tratados com Pirimetamina, foi possível determinar que, mesmo na menor dosagem utilizada (PM3), a droga foi eficaz no combate à fase aguda da doença, evidenciado pela taxa de 100% de sobrevivência obtida em todos os grupos analisados (as curvas encontram-se sobrepostas no gráfico), não havendo, portanto, diferença significativa entre os diferentes grupos tratados com Pirimetamina.

A mortalidade no grupo SDZ + PM, em vista dos resultados já descritos, não foi significativamente diferente do grupo PM3, mas foi diferente tanto do grupo controle quanto do grupo SDZ10.

Todos os camundongos sobreviventes apresentaram sorologia positiva para *T. gondii* após a realização de ELISA, comprovando o sucesso da infecção experimental.

Em relação à análise de cistos cerebrais, 50 dos 52 camundongos sobreviventes apresentavam cistos cerebrais. Não foi encontrada diferença significativa no número de cistos cerebrais entre os diversos grupos comparados, embora o alto desvio padrão das amostras limite a eficiência da análise (Tabela 3).

Quanto ao bioensaio, foi realizado para apenas dois animais do grupo PM50, sendo os resultados representados na Tabela 4. Ambos animais apresentaram resultado negativo, indicando a ausência de parasitos no cérebro dos camundongos inicialmente tratados.

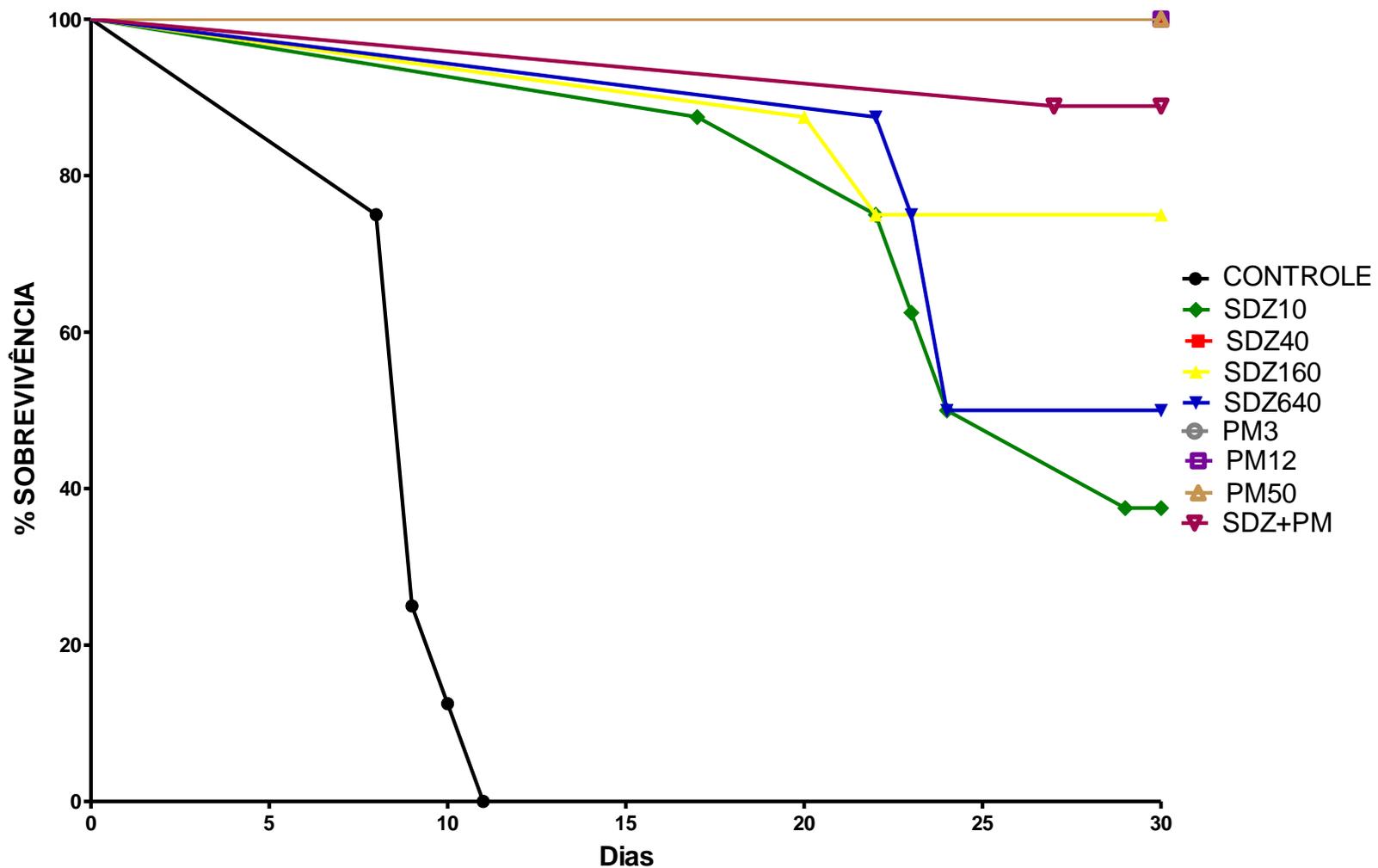


Figura 2: Porcentagem de sobrevivência acumulativa de camundongos Swiss, inoculados pela via intraperitoneal, com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 25 de *Toxoplasma gondii* e tratados pela via oral, 48 horas após a infecção, durante 10 dias com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), isoladas e em associação, e acompanhados até o 30º dpi.

Tabela 3: Sobrevivência e número médio de cistos cerebrais de camundongos inoculados com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 25 de *Toxoplasma gondii* e tratados com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), 48 horas após a infecção, durante 10 dias e acompanhados durante 30 dias.

<b>CEPA TgCTBr 25 (genótipo #206)</b>		
Medicamentos	Sobreviventes/Total	Média $\pm$ desvio padrão do Nº de cistos
Controle não tratado	0/8	-
SDZ10	3/8	5.200 $\pm$ 4.660
SDZ40	8/8	1.113 $\pm$ 795,4
SDZ160	6/8	1.417 $\pm$ 913,1
SDZ640	4/8	375 $\pm$ 95,74
PM3	8/8	714,3 $\pm$ 501,4
PM12	8/8	1.066 $\pm$ 1.926
PM50	8/8	82,5 $\pm$ 64,53
SDZ10 + PM3	7/8	408,6 $\pm$ 221,8

Tabela 4: Presença de cistos cerebrais e resultado sorológico de camundongos subinoculados via i.p. com cérebros de camundongos previamente infectados com a cepa TgCTBr 25 de *Toxoplasma gondii* e acompanhados durante 30 dias (bioensaio).

<b>CEPA TgCTBr 25 (genótipo #206) – BIOENSAIO</b>			
<b>MEDICAMENTOS</b>	<b>TOTAL DE BIOENSAIOS</b>	<b>CISTOS CEREBRAIS</b>	<b>ELISA</b>
		<b>Positivos/Negativos</b>	<b>Sobreviventes/Positivos</b>
PM50	2	0/2	2/0

#### **5.4. TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM A CEPA TgCTBr 4 (#108) UTILIZANDO SULFADIAZINA E PIRIMETAMINA, ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO**

As porcentagens de sobrevivência dos camundongos infectados com a cepa TgCTBr 4 e submetidos a diferentes tratamentos com Sulfadiazina e Pirimetamina foram representadas na figura 3. Todos os animais do grupo controle, não tratado, morreram até o 14º dia de infecção.

Em relação aos animais infectados e tratados com diferentes dosagens de Sulfadiazina, a taxa de mortalidade alcançou 100% em todos os grupos, com diferenças sendo observadas apenas na sobrevida conferida por cada uma das dosagens (Figura 3).

Em relação aos animais tratados com diferentes doses de PM, a dinâmica observada foi bastante semelhante, sendo observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos apesar da baixa taxa de sobrevivência observada (Figura 3). Mais uma vez, como foi observado em outras cepas, a associação das menores dosagens de SDZ e PM conferiu uma sobrevida significativamente maior quando comparada com as dosagens isoladamente.

Todos os camundongos sobreviventes apresentaram sorologia positiva para *T. gondii* após a realização de ELISA, comprovando o sucesso da infecção experimental. Dos seis animais sobreviventes, apenas um apresentou cistos cerebrais. Não foi possível analisar estatisticamente o número médio de cistos cerebrais devido ao baixo número de camundongos sobreviventes (Tabela 5).

O bioensaio foi realizado em cinco dos seis animais sobreviventes, devido à ausência de cistos teciduais no cérebro. Os resultados encontrados foram apresentados na Tabela 6. Todos os cinco bioensaios foram negativos.

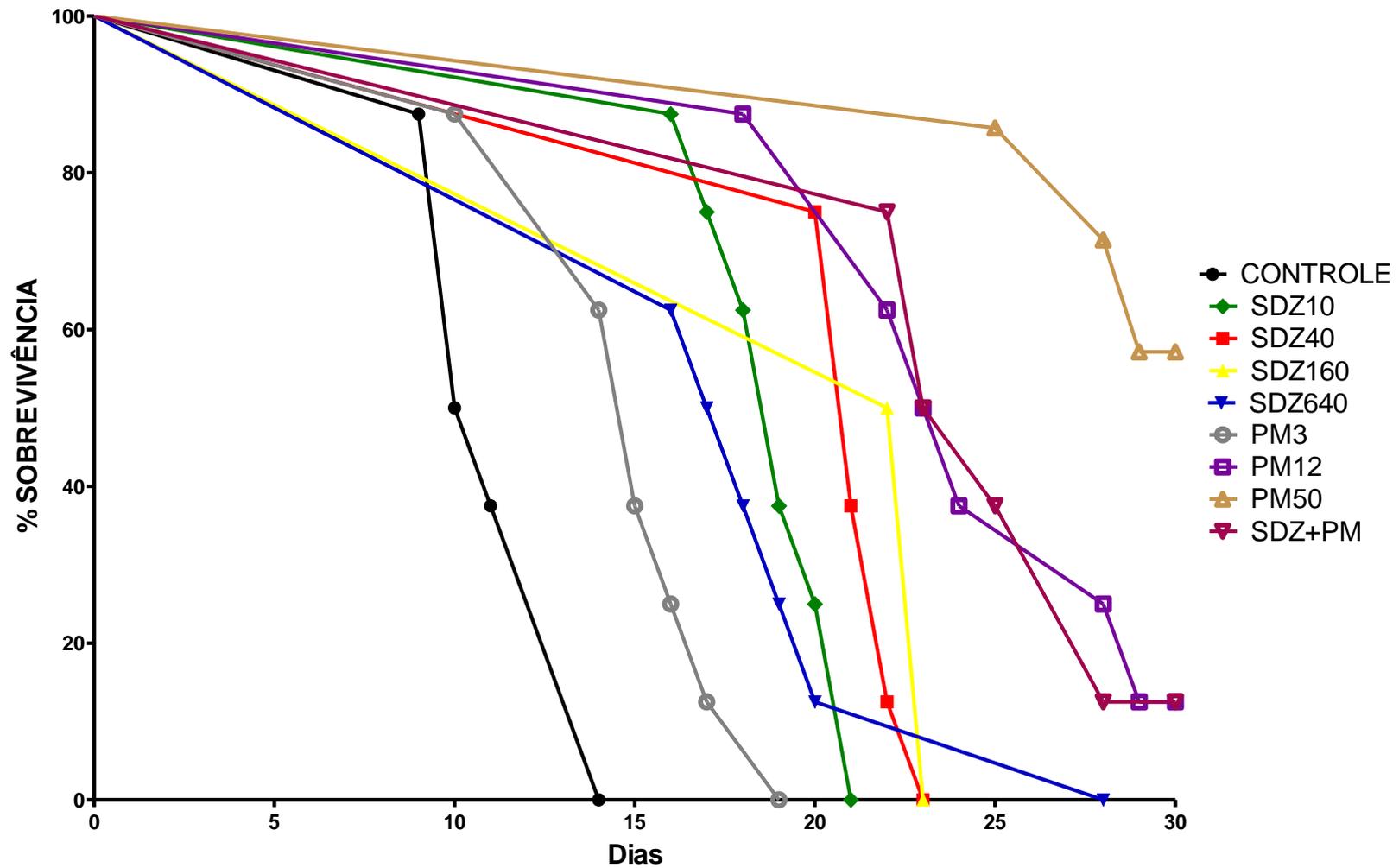


Figura 3: Porcentagem de sobrevivência acumulativa de camundongos Swiss, inoculados pela via intraperitoneal, com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 4 de *Toxoplasma gondii* e tratados pela via oral, 48 horas após a infecção, durante 10 dias com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), isoladas e em associação, e acompanhados até o 30º dpi.

Tabela 5: Sobrevivência e número médio de cistos cerebrais de camundongos inoculados com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 4 de *Toxoplasma gondii* e tratados com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), 48 horas após a infecção, durante 10 dias e acompanhados durante 30 dias.

<b>CEPA TgCTBr 4 (genótipo #108)</b>		
Medicamentos	Sobreviventes/ Total	Média $\pm$ desvio padrão do Nº de cistos
Controle não tratado	0/8	-
SDZ10	0/8	-
SDZ40	0/8	-
SDZ160	0/8	-
SDZ640	0/8	-
PM3	0/8	-
PM12	1/8	800
PM 50	4/7	0
SDZ10 + PM3	1/8	0

Tabela 6: Presença de cistos cerebrais e resultado sorológico de camundongos subinoculados via i.p. com cérebros de camundongos previamente infectados com a cepa TgCTBr 4 de *Toxoplasma gondii* e acompanhados durante 30 dias (bioensaio).

<b>CEPA TgCTBr4 (genótipo #108) – BIOENSAIO</b>			
MEDICAMENTOS	TOTAL DE BIOENSAIOS	CISTOS CEREBRAIS	ELISA
		Positivos/Negativos	Sobreviventes/Positivos
PM50	4	0/4	4/0
SDZ10 + PM3	1	0/1	1/0

## **5.5. TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM A CEPA TgCTBr 17 (#108) UTILIZANDO SULFADIAZINA E PIRIMETAMINA, ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO**

As porcentagens de sobrevivência dos camundongos infectados com a cepa TgCTBr 17 e submetidos a diferentes tratamentos com Sulfadiazina e Pirimetamina foram representadas na figura 4. Todos os animais do grupo controle não tratado morreram até o 12º dia de infecção. Todos os animais tratados apresentaram sobrevida e/ou sobrevivência significativamente maiores quando comparados ao grupo controle.

O grupo SDZ10, cuja mortalidade chegou a 100% no 19º dpi, foi estatisticamente diferente de todos os outros grupos tratados com SDZ, assim como aconteceu com o grupo SDZ40 e os demais grupos. No entanto, os grupos SDZ160 e SDZ640 não apresentaram diferenças significativas quando comparados.

Todos os grupos tratados com Pirimetamina apresentaram diferenças estatísticas quando comparados entre si, sendo possível observar diferenças tanto nas taxas de sobrevivência (0% para PM3, 25% para PM12 e 75% para PM50) quanto na dinâmica das mortes, que ocorreram de forma concentrada no 30º dia em PM50 e de maneira mais distribuída em PM3, com mortes ocorrendo em sete dias diferentes.

Mais uma vez, o grupo SDZ + PM manteve a tendência observada em cepas anteriores, aumentando a sobrevida e conferindo maior sobrevivência quando comparado com SDZ10 e PM3 isoladamente.

Todos os camundongos sobreviventes apresentaram sorologia positiva para *T. gondii* após a realização de ELISA, comprovando o sucesso da infecção experimental, exceto um animal pertencente ao grupo SDZ 640. Dos 12 animais sobreviventes, seis apresentaram cistos cerebrais. Entretanto não foi possível analisar estatisticamente os

dados obtidos devido ao baixo número de camundongos sobreviventes. (Tabela 7). O bioensaio foi realizado para seis animais, obtendo resultado negativo em todos (Tabela 8).

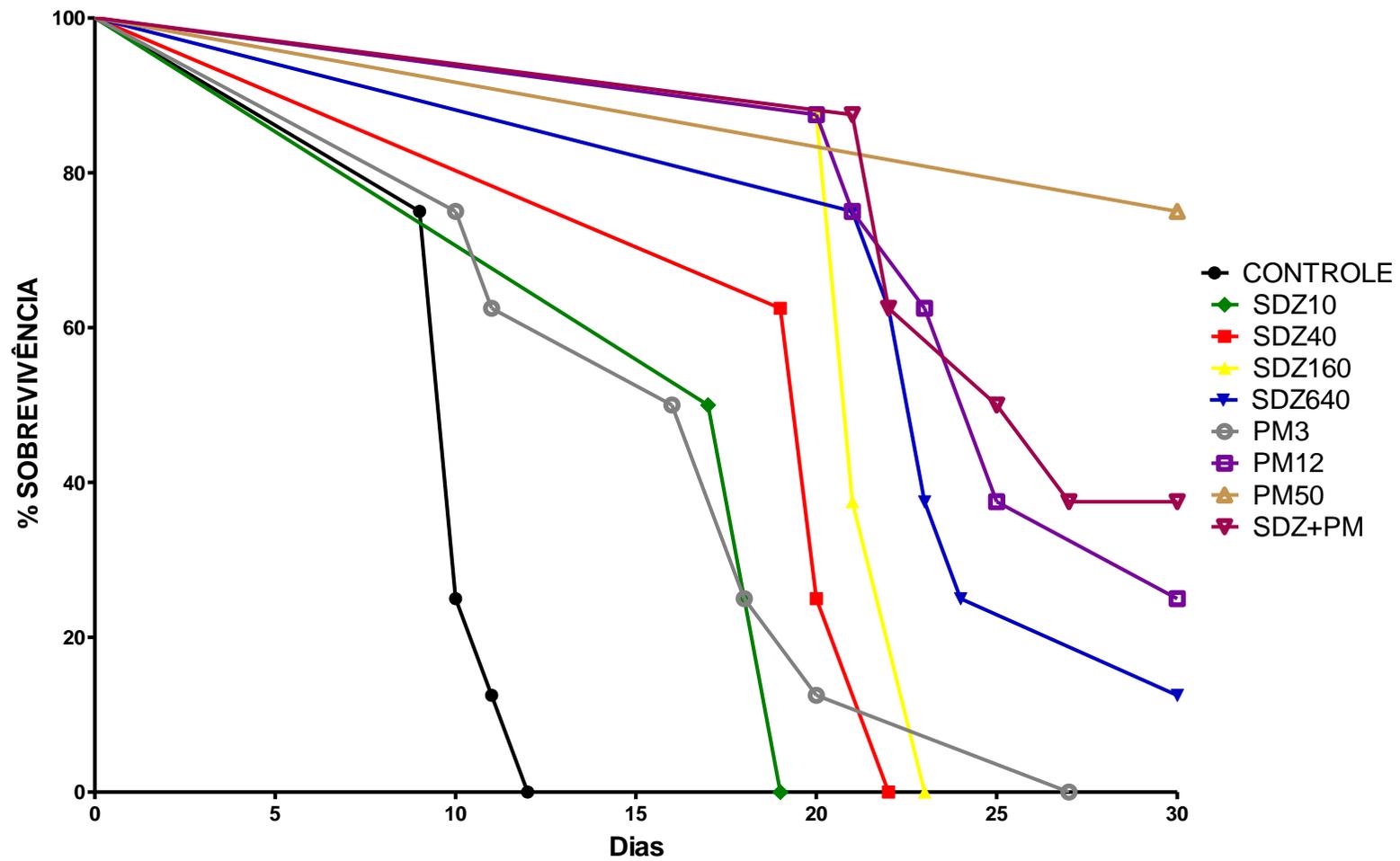


Figura 4: Porcentagem de sobrevivência acumulativa de camundongos Swiss, inoculados pela via intraperitoneal, com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 17 de *Toxoplasma gondii* e tratados pela via oral, 48 horas após a infecção, durante 10 dias com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), isoladas e em associação, e acompanhados até o 30º dpi.

Tabela 7: Sobrevivência e número médio de cistos cerebrais de camundongos inoculados com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 17 de *Toxoplasma gondii* e tratados com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), 48 horas após a infecção, durante 10 dias e acompanhados durante 30 dias.

CEPA TgCTBr 17 (genótipo #108)		
Medicamentos	Sobreviventes/ Total	Média $\pm$ desvio padrão do N° de cistos
Controle não tratado	0/8	-
SDZ10	0/8	-
SDZ40	0/8	-
SDZ160	0/8	-
SDZ640	1/8	0
PM3	0/8	-
PM12	2/8	300 $\pm$ 141,4
PM50	6/8	33,33 $\pm$ 81,65
SDZ10 + PM3	3/8	5.200 $\pm$ 7.795

Tabela 8: Presença de cistos cerebrais e resultado sorológico de camundongos subinoculados via i.p. com cérebros de camundongos previamente infectados com a cepa TgCTBr 17 de *Toxoplasma gondii* e acompanhados durante 30 dias (bioensaio).

<b>CEPA TgCTBr 17 (genótipo #108) – BIOENSAIO</b>			
MEDICAMENTOS	TOTAL DE BIOENSAIOS	CISTOS CEREBRAIS	ELISA
		Positivos/Negativos	Sobreviventes/Positivos
SDZ640	1	0/1	1/0
PM50	5	0/5	5/0

## **5.6. TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM A CEPA TgCTBr 9 (#BR II) UTILIZANDO SULFADIAZINA E PIRIMETAMINA, ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO**

As porcentagens de sobrevivência dos camundongos infectados com a cepa TgCTBr 9 e submetidos a diferentes tratamentos com Sulfadiazina e Pirimetamina foram representadas na figura 5. Todos os animais do grupo controle não tratado morreram até o 10º dia de infecção.

Com exceção do grupo controle, que atingiu 100% de mortalidade no 10º dpi, e do grupo SDZ 10, que atingiu o 30º dpi com uma taxa de sobrevivência de 87,5%, todos os grupos restantes apresentaram 100% de sobrevivência e foram representados por curvas sobrepostas na figura 5. Embora o grupo controle tenha sido significativamente diferente de todos os grupos tratados, não foram encontradas diferenças significativas em nenhum outro grupo quando comparados entre si, sugerindo que a cepa TgCTBr 9 pode apresentar um perfil de maior susceptibilidade à ação, tanto da Sulfadiazina quanto da Pirimetamina, especialmente quando comparada às outras cepas.

Todos os camundongos sobreviventes apresentaram sorologia positiva para *T. gondii* após a realização de ELISA, comprovando o sucesso da infecção experimental, exceto um animal pertencente ao grupo PM3. Dos 63 animais sobreviventes, 33 apresentaram cistos cerebrais.

Não foram observadas diferenças significativas no número de cistos cerebrais entre os grupos de animais tratados com Sulfadiazina (Tabela 9). No entanto, a situação se altera quando foram comparados os grupos tratados com Pirimetamina, já que o número de cistos cerebrais em camundongos tratados com PM3 foi significativamente maior que PM50 (Tabela 9). Também foram observadas diferenças significativas entre

os grupos SDZ 10 e PM3 quando comparados ao grupo SDZ + PM, especialmente pelo fato de não terem sido encontrados cistos teciduais nesse grupo.

No bioensaio (tabela 10), foi observado que, dos oito animais do grupo SDZ + PM em que foi realizado, sete apresentaram resultados negativos, isto é, ausência de cistos cerebrais e de anticorpos anti-*T.gondii*. O oitavo animal usado no bioensaio morreu durante os 30 dias de acompanhamento por infecção pelo *T. gondii*. Cabe ressaltar, que a capacidade de identificar cistos cerebrais utilizando a metodologia descrita neste trabalho como PESQUISA DE CISTOS é de, no mínimo, 50 cistos em todo o cérebro. Camundongos infectados e tratados, em que o número de cistos cerebrais é menor que 50, somente serão identificados como parasitados pelo bioensaio.

Resultados semelhantes foram observados para todos os outros esquemas terapêuticos em camundongos infectados com a cepa TgCTBr 9, indicando que a ausência de cistos observada pelo exame microscópico foi, em parte, confirmada pelos resultados de bioensaio. O bioensaio, portanto, mostrou que diversos animais infectados e tratados podem ter apresentado baixo número de cistos teciduais, especialmente nos grupos SDZ40, SDZ160 e PM12, em que todos os animais submetidos ao bioensaio apresentaram resultado positivo, com morte do animal subinoculado.

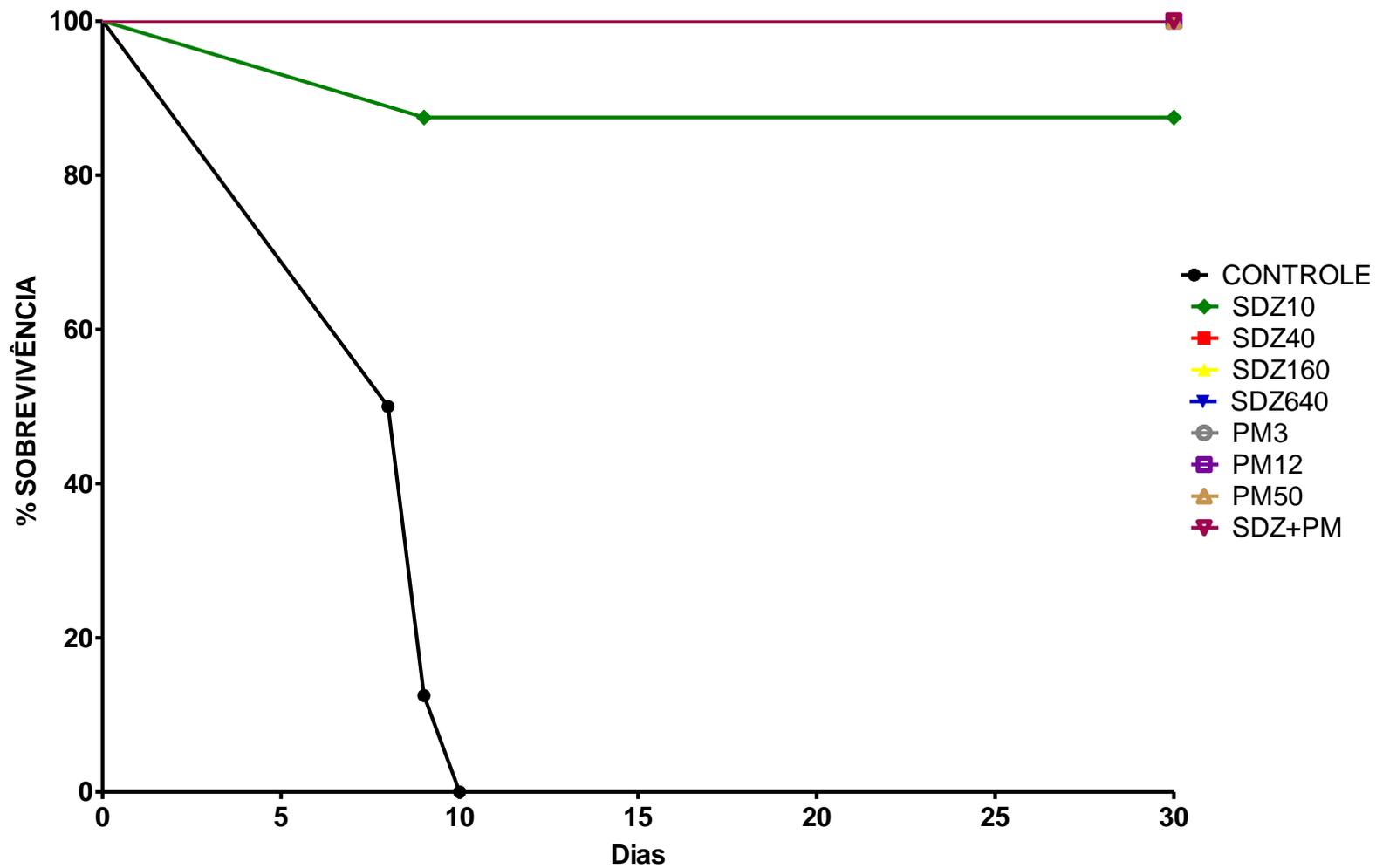


Figura 5: Porcentagem de sobrevivência acumulativa de camundongos Swiss, inoculados pela via intraperitoneal, com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 9 de *Toxoplasma gondii* e tratados pela via oral, 48 horas após a infecção, durante 10 dias com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), isoladas e em associação, e acompanhados até o 30º dpi.

Tabela 9: Sobrevivência e número médio de cistos cerebrais de camundongos inoculados com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 9 de *Toxoplasma gondii* e tratados com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), 48 horas após a infecção, durante 10 dias e acompanhados durante 30 dias.

<b>CEPA TgCTBr 9 (genótipo Br II)</b>		
<b>Medicamentos</b>	<b>Sobreviventes/ Total</b>	<b>Média <math>\pm</math> desvio padrão do N° de cistos</b>
Controle não tratado	0/8	-
SDZ10	7/8	871,4 $\pm$ 813,9
SDZ40	8/8	57,5 $\pm$ 72,85
SDZ160	8/8	47,5 $\pm$ 53,39
SDZ640	8/8	187,5 $\pm$ 229,5
PM3	8/8	631,3 $\pm$ 647,5
PM12	8/8	50 $\pm$ 53,45
PM50	8/8	0
SDZ10 + PM3	8/8	0

Tabela 10: Presença de cistos cerebrais e resultado sorológico de camundongos subinoculados via i.p. com cérebros de camundongos previamente infectados com a cepa TgCTBr 9 de *Toxoplasma gondii* e acompanhados durante 30 dias (bioensaio).

<b>CEPA TgCTBr 9 (genótipo #Br2) – BIOENSAIO</b>			
MEDICAMENTOS	TOTAL DE BIOENSAIOS	CISTOS CEREBRAIS	ELISA
		Positivos/Negativos	Sobreviventes/Positivos
SDZ40	4	1/3	1/0
SDZ 160	4	0/4	0/0
SDZ 640	2	1/1	1/0
PM12	4	0/4	0/0
PM50	8	2/6	6/0
SDZ10 + PM3	8	1/7	7/0

## **5.7. TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM A CEPA TgCTBr 13 (#208) UTILIZANDO SULFADIAZINA E PIRIMETAMINA, ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO**

As porcentagens de sobrevivência dos camundongos infectados com a cepa TgCTBr13 e submetidos a diferentes tratamentos com Sulfadiazina e Pirimetamina foram representadas na figura 6. Os animais do grupo controle atingiram uma sobrevivência superior a 15 dias pós infecção, fato que não ocorreu em nenhuma das demais cepas trabalhadas. No entanto, essa sobrevivência foi ainda significativamente menor quando comparada com todos os grupos submetidos a tratamento.

O grupo SDZ10 também apresentou sobrevivência significativamente menor quando comparado com os demais grupos tratados com SDZ (40, 160 e 640). Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas entre si, indicando que o tratamento a partir de 40mg/kg/dia conferiu sobrevida semelhante ao grupo SDZ640, apesar de ter atingido menor sobrevivência (50% e 87,5%, respectivamente).

Para os animais tratados com Pirimetamina, o grupo PM3 obteve sobrevivência significativamente menor quando comparado aos grupos PM12 e PM50, que por sua vez não apresentaram diferença significativa entre si.

Os resultados observados para os grupos tratados com medicação isoladamente indicaram que dosagens baixas (40mg para SDZ e 12mg para PM) foram tão eficazes quanto dosagens altas (640mg para SDZ e 50mg para PM) em prolongar a vida dos camundongos, indicando que o esquema terapêutico funciona de maneira satisfatória para animais infectados com TgCTBr 13. A associação SDZ + PM foi também significativamente mais efetiva no tratamento quando comparado com as dosagens de SDZ10 e PM3 isoladamente.

Todos os camundongos sobreviventes apresentaram sorologia positiva para *T. gondii* após a realização de ELISA, comprovando o sucesso da infecção experimental. Em relação à análise de cistos, dos 38 animais sobreviventes, em 31 foi observado um alto número de cistos cerebrais, com exceção dos animais do grupo PM50. Não foram encontradas, entretanto, diferenças significativas estatisticamente entre o número médio de cistos observados nos grupos (Tabela 11).

O bioensaio foi realizado para seis animais do grupo PM50 e um animal do grupo SDZ10 + PM3, sendo os resultados representados na tabela 12. Apenas um animal pertencente ao grupo PM50 não sobreviveu ao período de 30 dias, sendo o único com resultado positivo para o bioensaio.

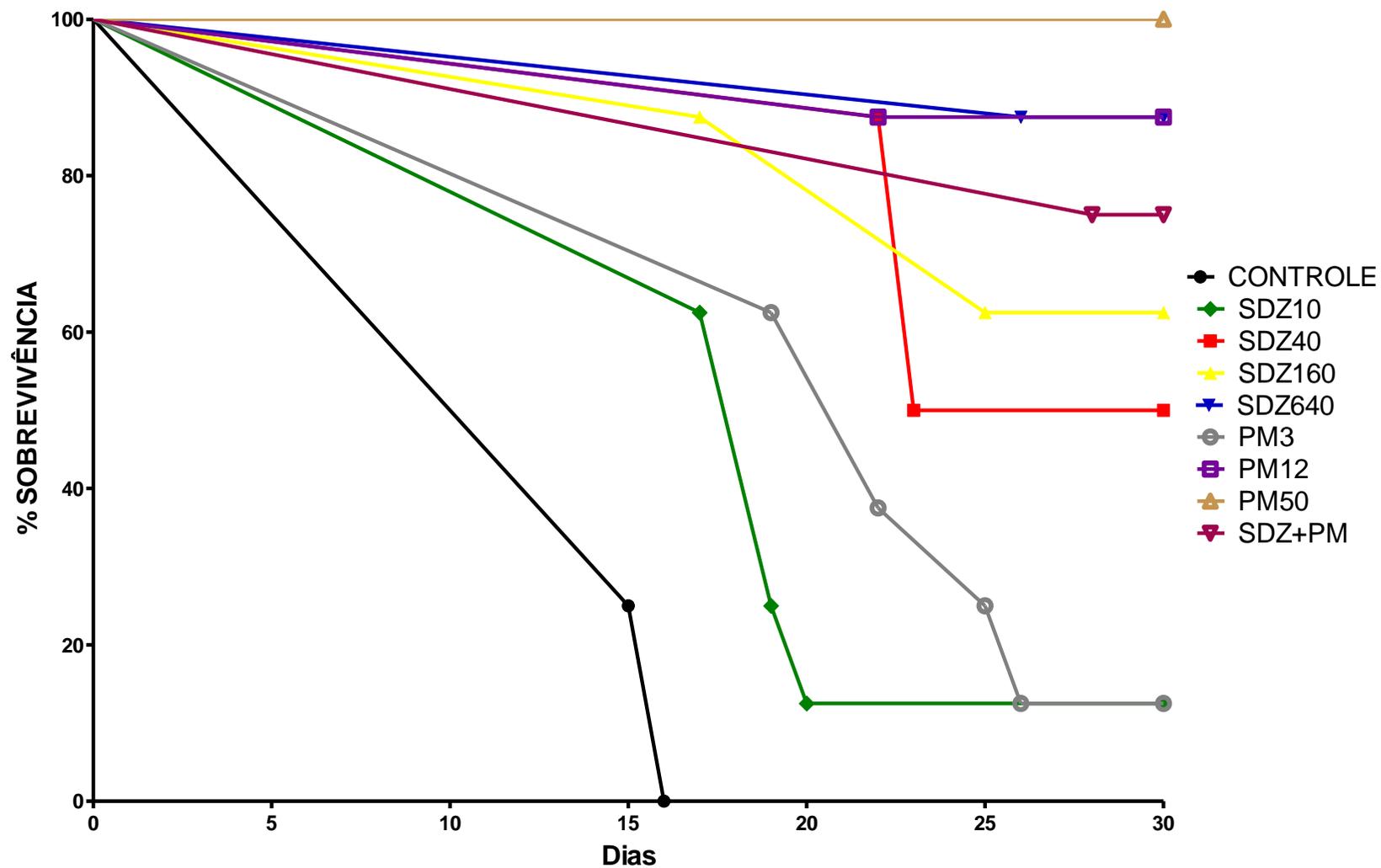


Figura 6: Porcentagem de sobrevivência acumulativa de camundongos Swiss, inoculados pela via intraperitoneal, com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 13 de *Toxoplasma gondii* e tratados pela via oral, 48 horas após a infecção, durante 10 dias com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), isoladas e em associação, e acompanhados

Tabela 11: Sobrevivência e número médio de cistos cerebrais de camundongos inoculados com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 13 de *Toxoplasma gondii* e tratados com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), 48 horas após a infecção, durante 10 dias e acompanhados durante 30 dias.

<b>CEPA TgCTBr 13 (genótipo #208)</b>		
Medicamentos	Sobreviventes/ Total	Média $\pm$ desvio padrão do N° de cistos
		-
Controle não tratado	0/8	
SDZ10	1/8	500
SDZ40	4/8	1.300 $\pm$ 1.152
SDZ160	5/8	1.060 $\pm$ 512,8
SDZ640	7/8	2.729 $\pm$ 2.933
PM3	1/8	1.400
PM12	7/8	1.757 $\pm$ 734,5
PM50	7/7	28,57 $\pm$ 75,59
SDZ10 + PM3	6/8	116,7 $\pm$ 98,32

Tabela 12: Presença de cistos cerebrais e resultado sorológico de camundongos subinoculados via i.p. com cérebros de camundongos previamente infectados com a cepa TgCTBr 13 de *Toxoplasma gondii* e acompanhados durante 30 dias (bioensaio).

<b>CEPA TgCTBr 13 (genótipo #208) – BIOENSAIO</b>			
MEDICAMENTOS	TOTAL DE BIOENSAIOS	CISTOS CEREBRAIS	ELISA
		Positivos/Negativos	Sobreviventes/Positivos
PM50	6	1/5	5/0
SDZ10 + PM3	1	0/1	1/0

## **5.8. TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM A CEPA TgCTBr 23 (#41) UTILIZANDO SULFADIAZINA E PIRIMETAMINA, ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO**

As porcentagens de sobrevivência dos camundongos infectados com a cepa TgCTBr 23 e submetidos a diferentes tratamentos com Sulfadiazina e Pirimetamina foram representadas na figura 7. Todos os animais do grupo controle não tratado morreram até o 12º dia de infecção.

Animais tratados com SDZ10 e SDZ40 apresentaram diferenças significativas, tanto quando comparados entre si quanto quando comparados a SDZ160 e SDZ640, embora SDZ40 e SDZ640 tenham atingido um mesmo percentual final de sobrevivência (12,5%). SDZ160 e SDZ640, por sua vez não apresentaram diferenças significativas entre si, apresentando curvas de sobrevivência com padrão similar.

Nos grupos tratados com Pirimetamina, PM3 foi significativamente menos eficaz quando comparado com PM12 e PM50, que não apresentaram diferença significativa entre si, obtendo 50% de sobrevivência.

Quando foram observados os resultados de sobrevivência obtidos para SDZ10 e PM3, foi possível afirmar que estes foram significativamente diferentes quando comparados ao grupo SDZ + PM, mais uma vez evidenciando que a associação entre as drogas, mesmo em dosagens que isoladamente não apresentam alta eficácia, é capaz de atingir resultados satisfatórios, comparáveis ou até mesmo melhores do que tratamentos com altas dosagens das drogas isoladas.

Todos os camundongos sobreviventes apresentaram sorologia positiva para *T. gondii* por ELISA. Em relação à comparação do número médio de cistos cerebrais, não

foi possível afirmar que existem diferenças estatísticas entre os grupos, com 13 dos 17 animais sobreviventes apresentando cistos cerebrais (Tabela 13).

O bioensaio foi realizado apenas para quatro animais, sendo três pertencentes ao grupo PM50. Apenas um apresentou resultado positivo (Tabela 14).

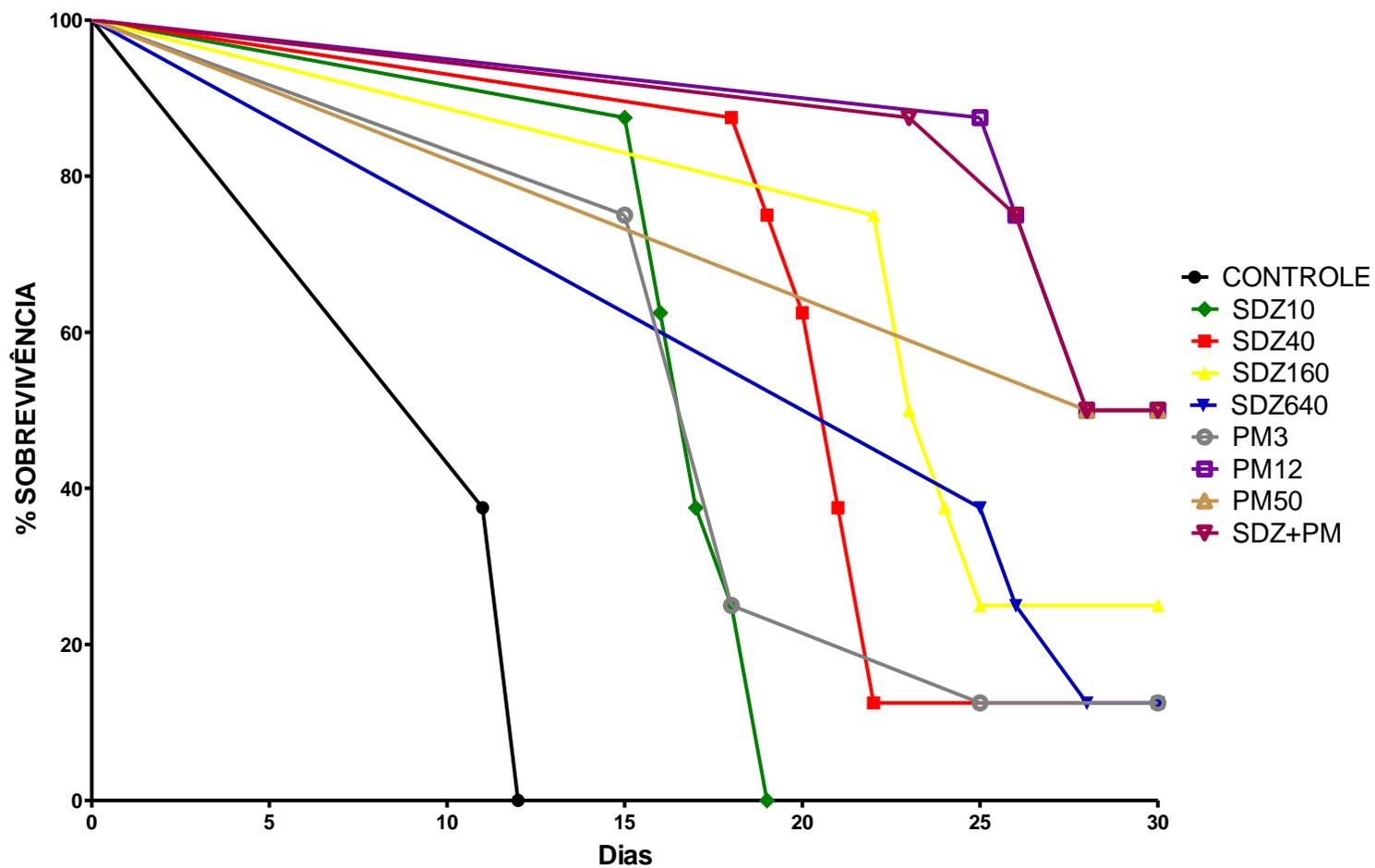


Figura 7: Porcentagem de sobrevivência acumulativa de camundongos Swiss, inoculados pela via intraperitoneal, com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 23 de *Toxoplasma gondii* e tratados pela via oral, 48 horas após a infecção, durante 10 dias com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), isoladas e em associação, e acompanhados até o 30º dpi.

Tabela 13: Sobrevivência e número médio de cistos cerebrais de camundongos inoculados com  $10^4$  taquizoítos da cepa TgCTBr 23 de *Toxoplasma gondii* e tratados com diferentes dosagens de Sulfadiazina (SDZ) e Pirimetamina (PM), 48 horas após a infecção, durante 10 dias e acompanhados durante 30 dias.

CEPA TgCTBr 23 (genótipo #41)		
Medicamentos	Sobreviventes/ Total	Média $\pm$ desvio padrão do Nº de cistos
Controle não tratado	0/8	-
SDZ10	0/8	-
SDZ40	1/8	22.400
SDZ160	2/8	6.900 $\pm$ 6.364
SDZ640	1/8	13.100
PM3	1/8	2.500
PM12	4/8	2.200 $\pm$ 2.285
PM50	4/8	25 $\pm$ 50
SDZ10 + PM3	4/8	2.250 $\pm$ 2.501

Tabela 14: Presença de cistos cerebrais e resultado sorológico de camundongos subinoculados via i.p. com cérebros de camundongos previamente infectados com a cepa TgCTBr 23 de *Toxoplasma gondii* e acompanhados durante 30 dias (bioensaio).

<b>CEPA TgCTBr 23 (genótipo #41) – BIOENSAIO</b>			
MEDICAMENTOS	TOTAL DE BIOENSAIOS	CISTOS CEREBRAIS	ELISA
		Positivos/Negativos	Sobreviventes/Positivos
PM50	3	1/2	2/0
SDZ10 + PM3	1	0/1	1/0

## 6. DISCUSSÃO

A toxoplasmose é reconhecida atualmente como doença de grande importância para grupos de indivíduos imunocomprometidos, como portadores de HIV e transplantados. Nesses indivíduos, a toxoplasmose tem características de infecção oportunista, muitas vezes causando quadros graves de encefalite e levando até a morte (Tenter *et al*, 2000).

A toxoplasmose congênita também é de grande importância, especialmente na América Latina, mais especificamente no Brasil, onde as infecções são comprovadamente mais graves e apresentam sintomatologia e sequelas mais acentuadas nos recém-nascidos (Vasconcelos-Santos *et al*, 2009). Essa sintomatologia mais pronunciada ocorre por uma série de fatores combinados, sendo destaques a ausência de programas de triagem eficientes, capazes de identificar o momento em que ocorre a soroconversão materna e, a partir desse evento, buscar um tratamento que evite ou diminua significativamente a chance de transmissão do parasito para o feto, e também devido à maior virulência que geralmente é observada nas cepas de *T. gondii* mais comuns no Brasil (Gilbert *et al*, 2008; Carneiro *et al*, 2013).

O tratamento da toxoplasmose consiste basicamente na associação entre a Sulfadiazina e a Pirimetamina (Petersen *et al*, 2007), duas drogas que, embora apresentem bom desempenho no combate ao *T. gondii* durante a fase aguda da doença, não são capazes de levar à cura total, principalmente devido à incapacidade de eliminação dos cistos teciduais, característicos da fase crônica da doença. Além dessa limitação, o tratamento com Sulfadiazina e Pirimetamina pode apresentar, especialmente em períodos mais prolongados, efeitos colaterais intensos que podem

indicar a interrupção do mesmo (Araújo *et al*, 1991), deixando poucas alternativas a pacientes cujos casos demandam tratamentos recorrentes.

Especificamente em relação às cepas de *T. gondii* presentes no Brasil, a ausência de estudos que avaliem a eficácia do esquema terapêutico sobre essas cepas representa um obstáculo no combate a toxoplasmose, já que, como citado acima, os casos que ocorrem no Brasil são comprovadamente mais graves do que os ocorridos na América do Norte e na Europa, localidades nas quais ocorrem cepas de genótipo clonal (em contraste com as cepas brasileiras, predominantemente atípicas) e onde são realizados a grande maioria dos estudos quimioterápicos.

#### **6.1. EFEITO DA SULFADIAZINA ISOLADAMENTE SOBRE DIFERENTES CEPAS DE *T. gondii*, GENOTIPICAMENTE ATÍPICAS**

A utilização da Sulfadiazina isoladamente como quimioterápico para o tratamento de toxoplasmose experimental em camundongos, causada por cepas virulentas isoladas no Brasil, e classificadas como geneticamente atípicas, apresentou eficácia variável entre as sete cepas analisadas.

Das sete cepas, em apenas uma (TgCTBr 9) as dosagens mais baixas de Sulfadiazina foram capazes de garantir alta sobrevivência aos camundongos. Nas demais cepas estudadas, as dosagens de 10mg e 40mg apresentaram, de forma geral, mortalidade acentuada, com pelo menos 50% dos animais não sobrevivendo ao curso de 30 dias do experimento. As dosagens de 160mg e 640mg apresentaram eficiência um pouco mais elevada, obtendo maior sobrevivência de maneira geral. No entanto, mesmo com as diferenças citadas nos índices de sobrevivência, as diferenças observadas foram, em sua maioria, sutis, indicando que, embora a dosagem da droga tenha sido aumentada

consideravelmente, o efeito da mesma não atinge, isoladamente, um desempenho satisfatório no tratamento da toxoplasmose. Khan *et al* (1997), já haviam demonstrado que, isoladamente, a Sulfadiazina não é totalmente eficiente para o tratamento da toxoplasmose. Utilizando a cepa clonal RH (tipo I), altamente virulenta, os autores obtiveram uma taxa de sobrevivência de apenas 20%, utilizando uma dosagem de 150mg/L de Sulfadiazina na água de beber dos animais. Alves & Vítor (2005) obtiveram níveis de sobrevivência variados para animais infectados com diferentes cepas (SAF, D4, D7, CH1 e CH3), com maior mortalidade em animais tratados com dose de 40mg de Sulfadiazina, chegando a 60% ou mais de sobrevivência em animais tratados com dosagens de 160mg e 320mg. Com relação à cepa EGS, de genótipo atípico e também utilizada no estudo, conclui-se que esse tratamento não foi eficaz para a cepa, como evidenciado pela taxa de sobrevivência de apenas 20% dos animais infectados (Alves & Vítor, 2005).

Um fato a ser notado é que, embora as cepas TgCTBr 25 e TgCTBr 1 apresentem um mesmo genótipo (#206), suas respostas ao tratamento foram diferenciadas, especialmente quando se observa as taxas de sobrevivência dos grupos tratados com baixas dosagens de Sulfadiazina (10 e 40mg). TgCTBr 1 foi menos susceptível a baixas doses de sulfadiazina que a cepa TgCTBr 25. Portanto, pode-se concluir que o genótipo das cepas, no caso acima observado, não é característica determinante para a eficácia do tratamento.

Nos experimentos com a cepa TgCTBr 4, que apresentou a maior taxa de mortalidade após terapia dentre todas as cepas estudadas, foi possível perceber que o tratamento com todas as dosagens de Sulfadiazina foi ineficaz, padrão que também foi observado, menos acentuadamente na cepa TgCTBr 17, pertencente ao mesmo genótipo da cepa TgCTBr 4. Essas observações sugerem que o genótipo #108 possa ter

características que o tornem menos susceptível a ação da Sulfadiazina. Uma cepa que apresenta resistência a Sulfadiazina já foi descrita, por Aspinall *et al* (2002) e, embora não seja possível afirmar que o genótipo #108 seja resistente, nossas observações indicam a necessidade de maiores investigações acerca das cepas desse genótipo.

Ao analisar os camundongos sobreviventes, não foi possível, em nenhum dos grupos, perceber alterações significativas no número de cistos cerebrais encontrados, devido ao baixo número de animais analisados e principalmente pela grande variabilidade no número total de cistos cerebrais em diferentes camundongos do mesmo grupo, o que resultou em desvio padrão muito elevado. Em trabalho realizado por Djurkovic-Djakovic *et al* (2002) a análise do número de cistos cerebrais forneceu resultados mais expressivos, sendo observado uma redução significativa no número total de cistos encontrados em camundongos tratados com uma combinação de Atovaquona e Clindamicina. No entanto, há que se ressaltar que, no trabalho citado, foi utilizada uma cepa clonal tipo II, avirulenta de caráter cistogênico (ME49) e que não causa a morte de animais não tratados, diferentemente das cepas utilizadas neste trabalho. Além disso, os medicamentos utilizados foram distintos, e, como citado anteriormente, diversos estudos já comprovaram que a Atovaquona apresenta atividade na eliminação de cistos teciduais. É provável que a combinação desses fatores tenha influenciado na adequação do uso do número de cistos cerebrais como parâmetro para avaliar a eficácia terapêutica observada por aqueles autores, ao contrário do presente trabalho.

Em relação a utilização do ELISA e do bioensaio como métodos diagnósticos complementares, com o objetivo principal de fornecer confirmação das infecções, é bastante relatado na literatura (Djurkovic-Djakovic *et al*, 1999; Djurkovic-Djakovic *et al*, 2002; Alves & Vítor, 2005) a eficácia desses métodos, apresentando alta

sensibilidade e especificidade e, portanto, apresentando resultados confiáveis para confirmar a infecção ou ausência da mesma no modelo murino de toxoplasmose.

## **6.2. EFEITO DA PIRIMETAMINA ISOLADAMENTE SOBRE DIFERENTES CEPAS DE *T. gondii*, GENOTIPICAMENTE ATÍPICAS**

A utilização da Pirimetamina isoladamente como quimioterápico para o tratamento de toxoplasmose experimental em camundongos, causada por cepas virulentas e geneticamente atípicas isoladas no Brasil, apresentou eficácia variável entre as sete cepas analisadas.

De forma geral, o tratamento com Pirimetamina isoladamente mostrou-se mais efetivo do que o tratamento isolado com Sulfadiazina, fator evidenciado pela recorrente maior sobrevivência de animais tratados com Pirimetamina. No entanto, o comportamento da droga quando observadas todas as cepas apresentou um padrão semelhante ao da Sulfadiazina, ou seja, em cepas nas quais houve maior mortalidade, essa mortalidade foi distribuída ao longo de todos os grupos.

Inicialmente este trabalho propunha a utilização de um grupo experimental extra, a ser tratado com uma dosagem de 200mg/kg por dia de Pirimetamina. No entanto, em um experimento prévio que avaliou a toxicidade das dosagens inicialmente selecionadas para a realização deste trabalho, a dose de 200mg mostrou-se altamente tóxica para camundongos, o que levou a sua exclusão nos experimentos posteriores. Diversos trabalhos, como Araújo *et al* (1991) já haviam relatado a alta toxicidade da Pirimetamina, citando inclusive que diversos casos necessitam de interrupção de tratamento.

Dentre todas as dosagens, os grupos de animais tratados com 50mg de Pirimetamina apresentaram a maior sobrevivência em todas as cepas estudadas, mostrando que essa dosagem é, por si só, eficaz em garantir maior sobrevivência a camundongos com toxoplasmose. Não foram avaliados, no entanto, possíveis efeitos colaterais ocasionados pela administração dessa alta dosagem, sendo impossível afirmar, portanto, a segurança total da utilização deste esquema frequentemente. Beverley *et al* (1957), através de um experimento com camundongos que foram alimentados com ração contendo diferentes níveis de Pirimetamina, estabeleceram que uma dosagem de 50mg/kg de Pirimetamina pode ser considerada como limítrofe para camundongos, pois acima dessa dosagem os animais apresentam maiores dificuldades para ganhar peso. Derouin *et al* (1992), definiram que a utilização de uma dosagem de 12,5mg/kg de Pirimetamina é considerada, para camundongos, como não curativa, sendo utilizada em nosso trabalho como dosagem intermediária para avaliação das diferenças entre uma dose elevada (50mg) e uma dose baixa (3,13mg). Outros estudos, como Araújo *et al* (1992) e Derouin *et al* (1991), utilizaram dosagens similares, de 15mg/kg e 18,5mg de Pirimetamina, respectivamente. Os resultados apresentados na literatura, em trabalhos realizados predominantemente utilizando a cepa clonal tipo I RH, que apresenta alta virulência para camundongos, mostram dados que corroboram as observações já apresentadas. Nestes trabalhos ressalta-se que o simples aumento de sobrevivência de camundongos infectados com a cepa RH já é indicativo de atividade do medicamento. Araújo *et al* (1992), em experimento que avaliou a ação da claritromicina em combinação com a pirimetamina, ao tratar um grupo de animais infectados com a cepa RH com 15mg durante 10 dias, obteve uma taxa de sobrevivência de 10%. Derouin *et al* (1992), em outro experimento com a cepa RH, tratou um grupo de camundongos infectados com uma dosagem de 12,5mg/kg de Pirimetamina, obtendo 100% de

letalidade, com uma média de sobrevivência de 21 dpi. Khan *et al* (1997), utilizando uma dosagem de 10mg/kg de Pirimetamina para tratar camundongos infectados com a cepa RH obtiveram taxa de sobrevivência de 30%, comprovando que a Pirimetamina, assim como observado para a Sulfadiazina, quando utilizada isoladamente, não apresenta grande eficácia no tratamento contra a toxoplasmose.

Assim como ocorrido para Sulfadiazina, a cepa TgCTBr 4 apresentou alta mortalidade para todos os grupos tratados com Pirimetamina, com essa mesma tendência ocorrendo (novamente menos acentuada) para a cepa TgCTBr 17. Esses resultados são mais uma evidência que sugere uma menor atividade de anti-folatos para tratamento da toxoplasmose causada pelo genótipo #108.

Da mesma maneira como ocorrido para Sulfadiazina, as cepas TgCTBr 25 e TgCTBr 1 apresentaram respostas diferenciadas ao tratamento com Pirimetamina, principalmente com PM 3, que apresentou sobrevivência superior para a cepa TgCTBr 25.

### **6.3. EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE UMA BAIXA DOSAGEM DE SULFADIAZINA E PIRIMETAMINA SOBRE DIFERENTES CEPAS DE *T. gondii*, GENOTIPICAMENTE ATÍPICAS**

A utilização de uma baixa dosagem de Sulfadiazina associada a uma baixa dosagem de Pirimetamina para o tratamento de toxoplasmose experimental em camundongos, causada por cepas virulentas e geneticamente atípicas isoladas no Brasil, apresentou boa eficácia nas sete cepas analisadas.

Ao se observar as curvas de sobrevivência dos camundongos pertencentes aos grupos de tratamento de Sulfadiazina 10mg e de Pirimetamina 3,13mg isoladamente,

ocorre de maneira geral um padrão de baixa sobrevivência. Ao serem combinadas, essas dosagens que mostravam baixa eficiência no tratamento da toxoplasmose em camundongos, passaram a apresentar altos índices de sobrevivência, provavelmente devido ao efeito sinérgico, já citado em outros trabalhos (Thiermann et al, 1978; Leport et al, 1988). Estes achados sugerem que o tratamento da toxoplasmose causada por cepas atípicas de *T. gondii* (predominantes no Brasil) pode ser realizada com o uso da associação de PM e SDZ em dosagens mais baixas e apresentar grande eficácia. Essa tendência foi observada para todas as cepas, inclusive para a cepa TgCTBr 4, que apresentou alta mortalidade de animais tratados e, no entanto, teve um animal sobrevivente pertencente ao grupo tratado com a associação das drogas.

Esses resultados indicam que é possível buscar novos protocolos de tratamento, que sejam focados na associação das drogas, no entanto com dosagens menores, de acordo com o quadro de evolução dos casos, visando uma diminuição de efeitos colaterais e, conseqüentemente, permitindo que o tratamento seja aplicado por períodos de tempo prolongados caso seja necessário.

O tratamento com Sulfadiazina e Pirimetamina, de animais experimentalmente infectados com cepas atípicas de *T. gondii* isoladas no Brasil, apresenta eficácia bastante variável, provavelmente relacionada a vários fatores, dentre eles a imunidade e idade do hospedeiro e virulência e cistogenicidade do parasito. É importante ressaltar que, devido à escassez de trabalhos que avaliem a eficácia de esquemas terapêuticos para o tratamento da toxoplasmose causada por cepas atípicas, largamente predominantes no território brasileiro, ainda são necessários diversos estudos complementares para fundamentar as tendências observadas neste trabalho, já que a maioria dos trabalhos existentes na literatura foi realizada utilizando principalmente a cepa RH, altamente virulenta, mas de genótipo clonal, perfil acistogênico e extremamente adaptada ao

cultivo em laboratório. Neste trabalho, analisando o comportamento de diferentes genótipos quando submetidos ao tratamento com diferentes dosagens de Pirimetamina e Sulfadiazina, além de uma combinação de baixa dosagem das duas drogas, observou-se que o genótipo chamado de #108 apresentou menor susceptibilidade ao tratamento, sugerindo que as cepas que apresentem tal genótipo devam ser melhor estudadas para confirmar essa tendência observada. Em contrapartida, outras cepas analisadas e pertencentes a outros genótipos apresentaram graus variados de susceptibilidade, como a cepa TgCTBr 9, do genótipo BrII, que é de grande circulação no Brasil, mostrando-se especialmente susceptível ao tratamento aplicado.

Para todas as crianças de onde foram isoladas as cepas de *T. gondii* foi prescrito tratamento com associação de Sulfadiazina (100 mg/kg/dia dividido em duas doses), Pirimetamina (1 mg/kg/dia durante os primeiros 6 meses, seguido pela mesma dose, 3 vezes por semana até 12 meses) e Ácido Fólico (7.5 mg, 3 vezes por semana) desde o dia em que foi confirmado o diagnóstico até completar 1 ano de tratamento (Vasconcelos-Santos *et al*, 2009). Das sete crianças, quatro receberam tratamento regular, durante 12 meses e sem a necessidade de interrupção (TgCTBr4, TgCTBr13, TgCTBr17, TgCTBr23) enquanto uma delas foi tratada regularmente durante 6 meses (TgCTBr25) e as outras duas crianças restantes não tinham dados ou apresentavam informações insuficientes sobre o tratamento (TgCTBr1 e TgCTBr9). O sangue para isolamento de *T. gondii* foi coletado 24 horas antes do início do tratamento (Carneiro *et al*, 2013) o que impediu que os parasitos isolados tivessem contato prévio com os medicamentos. Entretanto ainda precisa ser averiguada a evolução clínica de cada criança após o tratamento (acompanhada durante cinco anos de vida e ainda em análise - Vasconcelos-Santos DV, Comunicado pessoal) para comparação com nossos resultados de tratamento da toxoplasmose experimental. Entretanto cabe ressaltar que a

cepa TgCTBr 9 (a mais susceptível das sete cepas avaliadas) foi isolada de recém nascido com toxoplasmose congênita grave, com óbito após nove meses de nascimento, quando ainda fazia uso da associação SDZ+PM (Andrade GM, Comunicado pessoal). A morte da criança, no entanto, não implica em ineficácia do tratamento, visto que, além de não possuir dados confiáveis sobre a adesão e realização correta do tratamento citado anteriormente, fatores como a idade gestacional em que ocorreu a transmissão congênita e a própria virulência da cepa são determinantes na evolução da infecção no recém-nascido. Outro fato de importância foi a interrupção de tratamento em algumas crianças devido a ocorrência de depressão medular durante os 12 meses de terapia (Carellos *et al*, 2013).

Perspectivas futuras a serem exploradas incluem analisar um maior número de genótipos encontrados no Brasil, especialmente um maior número de cepas que apresentem o genótipo #108, a fim de obter subsídios que permitam afirmar ou não a menor susceptibilidade desse genótipo as drogas utilizadas para tratamento da toxoplasmose. A análise de possíveis mutações nos genes *dhfr* e *dhps* do parasito, possivelmente associadas a resistência de *T. gondii* à Sulfadiazina e Pirimetamina respectivamente (Reynolds *et al*, 2001; Aspinall *et al*, 2002), também poderá auxiliar em estudos sobre a variabilidade de eficácia do tratamento entre diferentes cepas do parasito.

## 7. CONCLUSÕES

As cepas de *T. gondii*, de genótipos atípicos, isoladas no Brasil de pacientes humanos com toxoplasmose congênita e virulentas para camundongos, apresentam resposta variável ao tratamento com diferentes dosagens de Sulfadiazina e Pirimetamina.

As cepas pertencentes ao genótipo #108 (TgCTBr 4 e TgCTBr 17) apresentaram menor susceptibilidade ao tratamento com ambas as drogas, isoladamente e associadas.

A cepa TgCTBr 9, pertencente ao genótipo Br II, de grande circulação no território brasileiro, apresentou maior susceptibilidade ao tratamento com ambas as drogas, isoladamente e associadas.

A associação de Sulfadiazina e Pirimetamina, em dosagens reduzidas, garante um tratamento mais eficaz contra a toxoplasmose experimental com cepas de *T. gondii* de genótipos atípicos isolados no Brasil.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajzenberg D 2011. Unresolved questions about the most successful known parasite.

**Expert Rev. Anti Infect. Ther.** , Vol. 9(2): 169–171.

Alves CF, Vitor RWA 2005. Efficacy of Atovaquone and Sulfadiazine in the Treatment of Mice Infected with *Toxoplasma gondii* Strains Isolated In Brazil. **Parasite**, Vol. 12, 171-177.

Araujo FG, Huskinson J, Remington JS 1991. Remarkable In Vitro and In Vivo Activities of the Hydroxynaphthoquinone 566C80 against Tachyzoites and Tissue Cysts of *Toxoplasma gondii*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Vol. 35(2), 293-299.

Araujo FG, Khan AA, Bryskier A, Remington JS 1998. Use of ketolides in combination with other drugs to treat experimental toxoplasmosis. **J Antimicrob Chemother**, Vol. 42, 665-667

Araujo FG, Prokocimer P, Lin T, Remington JS 1992. Activity of Clarithromycin Alone or in Combination with Other Drugs for Treatment of Murine Toxoplasmosis. **Antimicrob. Agents Chemother**, Vol. 36(11), 2454-2457.

Aspinall TV, Joynson DHM, Guy E, Hyde JE, Sims PFG 2002. The Molecular Basis of Sulfonamide Resistance in *Toxoplasma gondii* and Implications for the Clinical Management of Toxoplasmosis. **J Infect Dis**, Vol. 185:1637–43

Balaskas K, Vaudaux J, Boillat-Blanco N, Guex-Crosier Y 2012. Azithromycin versus Sulfadiazine and Pyrimethamine for non-vision-threatening toxoplasmic retinochoroiditis: A pilot study. **Med Sci Monit**, Vol. 18(5): CR296-302

Beverley JKA, Fry BA 1957. Sulphadimidine, Pyrimethamine And Dapsone In The Treatment Of Toxoplasmosis In Mice. **Brit. J. Pharmacol**, Vol. 12, 189.

Bosch-Driessen LH, Verbraak FD, Suttorp-Schulten MSA, Ruyven RLJV, Klok AM, Hoyng CB, Rothova A 2002. A Prospective, Randomized Trial of Pyrimethamine and Azithromycin Vs Pyrimethamine and Sulfadiazine for the Treatment of Ocular Toxoplasmosis. **Am J Ophthalmol**, Vol. 134, No. 1, 34-40

Carneiro ACAV, Andrade GM, Costa JGL, Pinheiro BV, Vasconcelos-Santos DV, Ferreira AM, Su C, Januário JN, Vitor RWA. 2013. Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* Revealed Highly Diverse Genotypes for Isolates from Newborns with Congenital Toxoplasmosis in Southeastern Brazil. **J Clin Microbiol**, Vol. 51(3), 901–907.

Carellos EVM, Andrade JQ, Romanelli RMC, Tiburcio JD, Januario JN, Santos DVV, Andrade GMQ 2013. Alta frequência de depressão medular durante a terapia para toxoplasmose congênita em uma coorte de crianças identificadas por triagem neonatal em Minas Gerais. In: II Simpósio brasileiro de toxoplasmose, 2013, São Paulo. Anais do II Simpósio brasileiro de toxoplasmose, 2013 p. 11-11.

Chêne G, Thiébaud R 2009. Options for clinical trials of pre and post-natal treatments for congenital toxoplasmosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Vol. 104 (2): 299-304.

Commodaro AG, Belfort RN, Rizzo LV, Muccioli C, Silveira C, Júnior MNB, Júnior RB 2009. Ocular toxoplasmosis - an update and review of the literature. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 104, (2): 345-350.

de Diego JA, Penin P, Arribas JR, Vásquez E, Vásquez JJ 1996. A clinical-parasitological monotherapy cure in the therapy of experimental infection by a highly virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Folia Microbiol.**, Vol. 41 (6), 513-516.

Derouin F, Piketty C, Chastang C, Chau F, Rouveix B, Pocidalo JJ 1991. Anti-Toxoplasma Effects of Dapsone Alone and Combined with Pyrimethamine. **Antimicrob. Agents Chemother**, Vol. 35(2), 252-255.

Derouin F, Almadany R, Françoise C, Bernard R, Pocidalo JJ 1992. Synergistic Activity of Azithromycin and Pyrimethamine or Sulfadiazine in Acute Experimental Toxoplasmosis. **Antimicrob. Agents Chemother**, Vol. 36(5), 997-1001.

Derouin F, Chastang C 1989. *In Vitro* Effects of Folate Inhibitors on *Toxoplasma gondii*. **Antimicrob. Agents Chemother**, Vol. 33(10), 1753-1759.

Djurkovic-Djakovic O, Milenkovic V, Nikolic A, Bobic B, Grujic J 2002. Efficacy of atovaquone combined with clindamycin against murine infection with a cystogenic (Me49) strain of *Toxoplasma gondii*. **J Antimicrob Chemother**, Vol. 50, 981–987.

Djurkovic-Djakovic O, Nikolic T, Robert-Gangneux F, Bobic B, Nikolic A 1999. Synergistic Effect of Clindamycin and Atovaquone in Acute Murine Toxoplasmosis. **Antimicrob. Agents Chemother**, 2240–2244.

Donald RGK, Roos DS 1993. Stable molecular transformation of *Toxoplasma gondii*: A selectable dihydrofolate reductase-thymidylate synthase marker based on drug-resistance mutations in malaria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Vol. 90, 11703-11707.

Dubey JP 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, Vol. 28(7), 1019-24.

Dubey JB, Lindsay DS, Speer CA 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clin Microbiol Rev**, Vol. 11(2)267–299.

Dubey JP, Velmurugan GV, Chockalingam A, Pena HFJ, Oliveira LN, Leifer CA, Gennari SM, Oliveira LMGB, Su C 2008. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Vet Parasitol** Vol. 157, 299–305.

Ferreira RA, Oliveira AB, Ribeiro MF, Tafuri WL, Vitor RW 2006. *Toxoplasma gondii*: In vitro and In vivo Activities of the Hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1,4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine. **Exp Parasitol**, Vol. 113 (2), 125-9.

Ferreira RA, de Oliveira AB, Gualberto SA, Miguel del Corral JM, Fujiwara RT, Gazzinelli Guimarães PH, de Almeida Vítor RW 2012. New naphthoquinones and an alkaloid with in vitro activity against *Toxoplasma gondii* RH and EGS strains. **Exp Parasitol**, Vol. 132 (4), 450-7.

Frenkel JK 1973. *Toxoplasma* in and around us. **Bioscience**, Vol. 23 (6),

Frenkel JK 1996. The stage-conversion time of *Toxoplasma gondii*: interpretation of chemical-biological data out of parasitologic or host context. **Parasitol Res**, Vol. 82 (7), 656-658

Fung HB, Kirschenbaum HL 1996. Treatment Regimens for Patients with Toxoplasmic Encephalitis. **Clinical Therapeutics**, Vol. 18 (6), 1037-56.

Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LMG, Tan HK, Wallon M, Buffolano W, Stanford MR, Petersen E 2008. Ocular Sequelae of Congenital Toxoplasmosis in Brazil Compared with Europe. **PLoS Negl Trop Dis**, Vol. 13;2 (8), e277.

GILL HS, AND PRAKASH O 1972. Chemoterapy and chemoprophylaxis of experimental toxoplasmosis. **Indian J Med Res**, Vol. 60, 1022-1027.

Gomes TC, Júnior HFA, Lescano SAZ, Amato-Neto V 2012. *In vitro* action of antiparasitic drugs, especially artesunate, against *Toxoplasma gondii*. **Rev Soc Med Bras Trop**, Vol. 45(4): 485-490.

Gross U, Holpert M, Goebel S 2004. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. **Ann 1<sup>st</sup> super sanità**, Vol. 40 (1), 65-70.

Howe DK, Sibley LD 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **J Infect Dis**, Vol. 172 (6), 1561-6.

Jin CM, Kaewintajuk K, Jiang JH, Jeong WJ, Kamata M, Kim HS, Wataya Y, Park H 2009. *Toxoplasma gondii*: A simple high-throughput assay for drug screening *in vitro*. **Exp Parasitol** Vol. 121, 132–136.

Khan AA, Slifer T, Araujo FG, Polzer RJ, Remington JS 1997. Activity of Trovafloxacin in Combination with Other Drugs for Treatment of Acute Murine Toxoplasmosis. **Antimicrob. Agents Chemother**, Vol. 41(5) 893–897.

Khan AA, Slifer TR, Araujo FG, Remington JS 2001. Activity of Gatifloxacin Alone or in Combination with Pyrimethamine or Gamma Interferon against *Toxoplasma gondii*. **Antimicrob. Agents Chemother**, Vol. 45(1), 48–51.

Leport C, Raffi F, Matheron S, Katlama C, Regnier B, Saimot AG, Marche C, Vedrenne C, Vilde JL 1998. Treatment of Central Nervous System Toxoplasmosis with Pyrimethamine/Sulfadiazine Combination in 35 Patients with the Acquired

Immunodeficiency Syndrome Efficacy of Long-Term Continuous Therapy. **Am J Med**, Vol. 84, 94-100.

Lipka B, Milewska-Bobula B, Filipek B 2011. Monitoring of plasma concentration of pyrimethamine (PYR) in infants with congenital *Toxoplasma gondii* infection – own observations. **Wiad Parazytol**, Vol. 57(2), 87-92.

Mack DG, McLeod R 1984. New Micromethod to Study the Effect of Antimicrobial Agents on *Toxoplasma gondii*: Comparison of Sulfadoxine and Sulfadiazine Individually and in Combination with Pyrimethamine and Study of Clindamycin, Metronidazole, and Cyclosporin A. **Antimicrob. Agents Chemother**, Vol. 26 (1) ,26-30.

Martins-Duarte ES, Souza W de, Vommaro RC 2013. *Toxoplasma gondii*: the effect of fluconazole combined with sulfadiazine and pyrimethamine against acute toxoplasmosis in murine model. **Exp Parasitol**, Vol 133, 294-299.

McFadden DC, Camps M, Boothroyd JC 2001. Resistance as a tool in the study of old and new drug targets in *Toxoplasma*. **Drug Resist Updat**, Vol 4, 79–84.

McLeod R, Mack D, Foss R, Boyer K, Withers S, Levin S, Hubbell J, The Toxoplasmosis Study Group 1992. Levels of Pyrimethamine in Sera and Cerebrospinal and Ventricular Fluids from Infants Treated for Congenital Toxoplasmosis. **Antimicrob. Agents Chemother**, Vol. 36 (5), 1040-1048.

Meneceur P, Bouldouyre MA, Aubert D, Villena I, Menotti J, Sauvage V, Garin JF, Derouin F 2008. *In Vitro* Susceptibility of Various Genotypic Strains of *Toxoplasma gondii* to Pyrimethamine, Sulfadiazine, and Atovaquone. **Antimicrob. Agents Chemother**, Vol. 52(4), 1269–1277.

Mishra SK, Singh P, Rath SK 2011. A study of toxicity and differential gene expression in murine liver following exposure to anti-malarial drugs: amodiaquine and sulphadoxine-pyrimethamine. **Malar J**, Vol. 10:109.

Pashley TV, Volpe F, Pudney M, Hyde JE, Sims PFG, Delves CJ 1997. Isolation and molecular characterization of the bifunctional hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase gene from *Toxoplasma gondii*. **Mol Biochem Parasitol**, Vol. 86, 37-47.

Pena, H.F.G., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **Int. J. Parasitol.** Vol. 38, 561–569.

Petersen E 2007. Toxoplasmosis. **Semin Fetal Neonatal Med**, Vol. 12, 214e223.

Peyron F, Eudes N, Monbrison F, Wallon M, Picot S 2004. Fitness of *Toxoplasma gondii* is not related to DHFR single-nucleotide polymorphism during congenital toxoplasmosis. **Int J Parasitol Semin Fetal Neonatal Med**, Vol. 34, 1169–1175.

Reynolds MG, Roos DS 1998. A Biochemical and Genetic Model for Parasite Resistance to Antifolates *Toxoplasma gondii* Provides Insights Into Pyrimethamine And

Cycloguanil Resistance In *Plasmodium falciparum*. **J Bio Chem**, Vol. 273 (6), 3461–3469.

Reynolds MG, Oh J, Roos DS 2001. *In vitro* generation of Novel Pyrimethamine resistance mutations in the *Toxoplasma gondii* Dihydrofolate Reductase. **Antimicrob. Agents Chemother**, Vol. 45, 1271-1277.

Romand S, Pudney M, Derouin F 1993. *In vitro* and *In vivo* activities of the hydroxynaphthoquinone atovaquone alone or combined with pyrimethamine, sulfadiazine, clarithromycin, or minocycline against *Toxoplasma gondii*. **Antimicrob. Agents Chemother** Vol. 37 (11), 2371-2378.

Roos, DS 1993. Primary structure of the Dihydrofolate Reductase- Thymidylate Synthase gene from *Toxoplasma gondii*. **J bio chem**, Vol. 268 (9), 6269-6280.

Su C, Zhang X, Dubey JP 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. **Int j Parasit**, Vol 36, 841-848.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int j Parasitol**, Vol 30, 1217-1258.

Thiermann E, Apt W, Atias A, Lorca M, Olgún J 1978. A comparative study of some combined treatment regimens in acute toxoplasmosis in mice. **Ame J Trop Med Hyg**, Vol. 27, 747-750.

Van de Ven ES, Galama J, Vree T, Camps W, Baars I, Eskes T, Meuwissen J, Melchers W 1995. Study of treatment of congenital *Toxoplasma gondii* infection on Rhesus monkeys with pyrimethamine and sulfadiazine. **Antimicrob. Agents Chemother**, Vol 39 (1), 137-144.

Vasconcelos-Santos DV, Machado Azevedo DO, Campos WR, Orétice F, Queiroz-Andrade GM, Castro-Romanelli RM, Januário JN, Resende LM, Martins-Filho AO, de Aguiar Vasconcelos Carneiro AC, Almeida Vítor RW, Calaffa WT 2009. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. **Ophthalmology**, Vol 116 (11), 2199-2205.

Stanford MR, Gilbert RE 2009. Treating ocular toxoplasmosis - current evidence, **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 104(2): 312-315.

WERNER H, MASIHI KN, TISCHER I, ADUSU E 1977. The effect of chemotherapeutic immunotherapy with SDDS, pyrimethamine, and anti- toxoplasma serum on *Toxoplasma gondii* cysts in latent infected NMRI mice. *Tropenmed Parasitol*, v. 28, p. 528-532,.

Yan-Bo Zeng, Shun-Hai Zhu, Hui Dong, Hong-Yu Han, Lian-Lian Jiang, Quan Wang, Jun Cheng, Qi-Ping Zhao, Wei-Jiao Ma, Bing Huang 2012. Great efficacy of Sulfachloropyrazine-sodium against acute murine toxoplasmosis. **Asian Pacific j trop biomed**, Vol. 2(1), 70-75.

## **9. ANEXO**

### **9.1. CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - PROTOCOLO CEUA nº 257/2012**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo CEUA nº 257/2012**, relativo ao projeto intitulado "*Efeito da sulfadiazina e da pirimetamina sobre isolados de Toxoplasma gondii obtidos de humanos com toxoplasmose congênita em Minas Gerais*", que tem como responsável(is) **Ricardo Wagner de Almeida Vitor**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)*, tendo sido aprovado na reunião de **26/09/2012**.

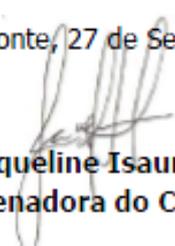
Este certificado expira-se em **26/09/ 2017**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol CEUA nº 257/2012**, related to the project entitled "*Effect of sulfadiazin and pirimetamin on human isolates of toxoplasma gondii obtained from congenitally infected individuals in Minas Gerais*", under the supervisors of **Ricardo Wagner de Almeida Vitor**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the *Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)*, and was approved in **September 26, 2012**.

This certificate expires in **September 26, 2017**.

Belo Horizonte, 27 de Setembro de 2012.

  
**Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
Coordenadora do CETEA/UFMG