

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

KENYA MARA DE SOUZA MALTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS INIBIDORES VIRAIS, LOPINAVIR E  
PRITELIVIR, CONTRA OS PROTOZOÁRIOS *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma  
cruzi***

Belo Horizonte

2021

KENYA MARA DE SOUZA MALTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS INIBIDORES VIRAIS, LOPINAVIR E  
PRITELIVIR, CONTRA OS PROTOZOÁRIOS *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma  
cruzi***

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

**Área de concentração:** Protozoologia

**Orientadora:** Profa. Dra. Érica dos Santos  
Martins-Duarte

Belo Horizonte

2021

043 Malta, Kenya Mara de Souza.  
Avaliação da atividade dos inibidores virais Lopinavir e Pritelivir contra os protozoários *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Kenya Mara de Souza Malta. – 2021.

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

Orientadora: Profa. Dra. Érica dos Santos Martins-Duarte.

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

1. Parasitologia. 2. Reposicionamento de Medicamentos. 3. Antivirais. 4. *Toxoplasma*. 5. *Trypanosoma cruzi*. 6. Toxoplasmose. 7. Doença de Chagas. I. Martins-Duarte, Érica dos Santos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO****Kenya Mara de Souza Malta**425/2021/08  
entrada  
1º/2019  
2019654088

Às quatorze horas do dia 05 de julho do ano de 2021, reuniu-se, por videoconferência, sala <https://meet.google.com/itp-wwre-cxh>, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: “Avaliação da atividade dos inibidores virais, Lopinavir e Pritelivir, contra os protozoários *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*” área de concentração: **Protozoologia**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Dra. Erica dos Santos Martins Duarte**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(a) candidato(a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Erica dos Santos Martins Duarte	UFMG	Aprovada
Dra. Emile Santos Barrias	Inmetro	Aprovada
Dra. Juliany Cola Fernandes Rodrigues	UFRJ	Aprovada
Dr. Rafael Pinto Vieira	UFMG	Aprovada

**Expedição do resultado final.**

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

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	Passadas a aluna durante a arguição

Pelas indicações, o(a) candidato(a) foi considerado(a): **Aprovada**

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

**Belo Horizonte, 05 de julho de 2021.**

**Dra. Erica dos Santos Martins Duarte**

(Orientadora)

**Dra. Emile Santos Barrias**

**Dra. Juliany Cola Fernandes Rodrigues**

**Dr. Rafael Pinto Vieira**

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Profa. Dra. Érica dos Santos Martins Duarte, no Laboratório Quimioterapia de Protozoários Egler Chiari no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Agradecimento aos colaboradores Leandro Sangenito e André Luís Souza dos Santos do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG)- UFRJ.

Apoio Financeiro:

Projeto Universal CNPq edital 2018

Edital 09/2019 - Recém-doutores PRPq UFMG

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, meu marido Mateus, que sem sua ajuda, paciência e motivação não teria conseguido, aos meus filhos, Giovanna e Tiago, peço desculpas pela ausência da mamãe ao longo deste percurso. À minha mãe e aos meus irmãos pelo grande suporte e apoio aos meus filhos.

À minha orientadora, a professora Dra. Érica dos Santos Martins Duarte, pela oportunidade, pela confiança depositada em mim, pela paciência e por sempre me incentivar a buscar o conhecimento.

À Rosa, uma pessoa incrível, atenciosa, amorosa, com ensinamentos que irão do laboratório para a vida! Muito obrigada Rosinha!

À Gabriella Bessa, que fez com que meus dias na UFMG fossem mais leves com suas conversas e confidências. Agradeço imensamente pela sua ajuda e suporte em meus experimentos. Muito obrigada!

Ao professor Ricardo Wagner, uma pessoa iluminada, por suas palavras e presença que sempre emanam tranquilidade e boas vibrações.

Aos meus colegas de mestrado, levo todos no coração, e para a vida toda. Lembranças que nunca mais deixarão de ser parte de mim. Em especial, para minhas meninas Daniela e Larissa, uma amizade que nem a pandemia me afastou, muito obrigada pela leveza, distrações, alegrias e gargalhadas que nossas conversas me proporcionaram.

Ao Departamento de Parasitologia, as secretárias Sumara e Sibebe, pelo apoio e atenção dedicados a todos os alunos, além de todos os professores da Pós-Graduação, que me ajudaram na formação como parasitologista.

E pela oportunidade de conhecer e doar um pouco de conhecimento, trabalho, amor e carinho ao lindo projeto realizado pelo Departamento de Parasitologia em São Joaquim/Januária/MG.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

## RESUMO

Apesar do progresso alcançado no conhecimento básico sobre *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*, assim como a descoberta de diversos compostos com atividade para estes protozoários, a Doença de Chagas e a Toxoplasmose ainda retratam alta morbidade e em algumas de suas manifestações, alta mortalidade. Pela falta de fármacos que atuem na fase crônica destas doenças, como também pelos elevados efeitos adversos causados pelos tratamentos atuais. A falta de interesse da indústria farmacêutica em desenvolver tratamentos para as doenças tropicais se deve principalmente porque não oferecem retornos financeiros suficientes. O reposicionamento de fármacos é uma estratégia onde drogas desenvolvidas e em uso para determinada doença podem ser re-avaliadas para a utilização em outra indicação, reduzindo assim o tempo e custo de pesquisas e com segurança já conhecida. Sendo assim, este trabalho avaliou a atividade de dois antivirais, Lopinavir e Pritelivir, contra taquizoítos das cepas RH, TgCTBr8 e TgCTBR5 de *Toxoplasma gondii* e Cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Para tanto, foi analisada in vitro a capacidade dos antivirais de interromper a proliferação destes parasitos, e além disso, para *T. gondii*, foi avaliada a capacidade de inibição da invasão com taquizoítos pré-tratados, a atividade proliferativa da combinação sulfadiazina (SDZ) e pirimetamina (PYR) em associação ou não com Lopinavir e análise do potencial cistogênico causado pelo tratamento. Para a análise in vivo foram avaliados para *T. gondii* a eficácia do tratamento em modelos de infecção aguda e crônica. Lopinavir foi capaz de inibir 78% da proliferação das cepas TgCTBr8 e TgCTBr5 com 7 e 15  $\mu\text{M}$  respectivamente, e também foi capaz de inibir em 56% a invasão de taquizoítos com 7  $\mu\text{M}$  na cepa TgCTBr8 e 35% com 15  $\mu\text{M}$  na cepa TgCTBr5. Em relação ao tratamento padrão da toxoplasmose (SDZ+PYR), a cepa TgCTBr5 se demonstrou mais suscetível que a cepa TgCTBr8, enquanto que a associação deste tratamento com Lopinavir apresentou antagonismo, aumentando a proliferação da cepa TgCTBr5. O ensaio de cistogênese demonstrou que a cepa TgCTBr8 tem maior capacidade cistogênica espontânea ou induzida pelo Lopinavir. Já nos ensaios in vivo de fase aguda, o tratamento combinado do antiviral e os antifolatos, não afetou a sobrevivência dos animais, mas foi capaz de reduzir a carga de cistos cerebrais, se comparado ao grupo tratado apenas com os antifolatos. Já o tratamento isolado com Lopinavir em ensaio crônico da doença demonstrou uma moderada diminuição de cistos cerebrais. E em relação ao Pritelivir, uma redução na proliferação de *T. gondii* e de *T. cruzi* de 77% e 80%, respectivamente, foi obtida com a utilização de 60  $\mu\text{g/mL}$  nos tratamentos por 48 horas. Foram obtidos  $\text{IC}_{50}$  nos valores de 14,7 e 34,85  $\mu\text{g/mL}$  em 24 horas de tratamento e 37,3 e 22,40  $\mu\text{g/mL}$  em 48 horas de tratamento para *T. gondii* e *T. cruzi*, respectivamente. Nossos resultados mostram que os antivirais aqui estudados podem ser alternativas promissoras ao desenvolvimento de novas terapias para a Toxoplasmose e da Doença de Chagas.

Palavras-chave: reposicionamento de fármacos, antiviral, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, toxoplasmose, doença de Chagas.

## ABSTRACT

Despite the progress in basic knowledge about *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*, as well as the discovery of several compounds with activity for these protozoa, Chagas' disease and Toxoplasmosis still portray high morbidity and in some of its manifestations, high mortality. Due to the lack of drugs that act in the chronic phase of these diseases, as well as the high adverse effects caused by current treatments. The pharmaceutical industry's lack of interest in developing treatments for tropical diseases is mainly because it does not offer sufficient financial returns. It is mainly due to their lack of financial returns. Drug repositioning is a strategy in which drugs developed and in use for a given disease can be re-evaluated for use in another indication, thus reducing the time and cost of research and with known safety. Therefore, this work evaluated the activity of two antivirals, Lopinavir and Pritelivir, against tachyzoites of the RH strains, TgCTBr8 and TgCTBR5 of *T. gondii* and Y strain of *T. cruzi*. Therefore, the in vitro capacity of antivirals to interrupt the proliferation of these parasites was analyzed, and in addition, for *T. gondii*, the capacity to inhibit invasion with pretreated tachyzoites, the proliferative activity of the combination of Lopinavir with sulfadiazine (SDZ) and pyrimethamine (PYR) and analysis of the cystogenic potential caused by the treatment were also evaluated. For the in vivo analysis, the efficacy of treatment in acute and chronic infection models was evaluated for *T. gondii*. Lopinavir was able to inhibit 78% of the proliferation of TgCTBr8 and TgCTBr5 strains with 7 and 15  $\mu\text{M}$ , respectively, and was also able to inhibit by 56% the invasion of tachyzoites with 7  $\mu\text{M}$  in the TgCTBr8 strain and 35% with 15  $\mu\text{M}$  in the TgCTBr5 strain. Regarding the standard treatment for toxoplasmosis (SDZ+PYR), the TgCTBr5 strain was more susceptible than the TgCTBr8 strain, while the association of this treatment with Lopinavir presented antagonism, increasing the proliferation of the TgCTBr5 strain. The cystogenesis assay demonstrated that the TgCTBr8 strain has a greater spontaneous or induced cystogenic capacity by Lopinavir. In the acute phase in vivo trials, the combined treatment of antivirals and antifolates did not affect animal survival, but was able to reduce the burden of brain cysts, when compared to the group treated only with antifolates. On the other hand, the isolated treatment with Lopinavir in a chronic trial of the disease showed a moderate decrease in brain cysts. About Pritelivir, a reduction in the proliferation of *T. gondii* and *T. cruzi* of 77% and 80%, respectively, was obtained with the use of 60  $\mu\text{g/mL}$  in treatments for 48 hours.  $\text{IC}_{50}$  values of 14.7 and 34.85  $\mu\text{g/mL}$  in 24 hours of treatment and 37,3 and 22,40  $\mu\text{g/mL}$  in 48 hours of treatment were obtained for *T. gondii* and *T. cruzi*, respectively. Our results show that the antivirals studied here can be promising alternatives for the development of new therapies for Toxoplasmosis and Chagas Disease.

Keywords: drug repositioning, antiviral, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, toxoplasmosis, Chagas Disease.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ciclo Biológico do *Toxoplasma gondii*. (A) Eliminação de oocistos não esporulados por felídeos infectados após gametogênese e formação de um oocisto, após esporulação no ambiente se tornam infecciosos; (B) Oocistos esporulados no ambiente contaminam o solo, água e alimentos e (C) São ingeridos por outros felídeos ou pelos hospedeiros intermediários (homem, aves, gado, etc.), causando infecção aguda seguida de formação de cistos teciduais; (D) Transmissão através da ingestão de cistos teciduais (predação ou alimentação); (E) Transmissão transplacentária durante infecção aguda; (F) Transmissão através de transfusão sanguínea; (G) Transplante de órgãos com cistos tissulares. (Retirado de Lara *et al.*, 2017).....19
- Figura 2:** Estágios infectantes de *T. gondii*. (A) Desenho esquemático de um taquizoíto (Retirado de Souza *et al.*, 2010) (B) Desenho esquemático de um bradizoíto (Retirado de Martins-Duarte, 2011). (C) Cisto tecidual. (D) Oocisto (Retirados de Dubey *et al.* 1998).....20
- Figura 3:** Diagrama simplificado do processo de divisão do *T. gondii* por endodiogenia (Retirado de Souza *et al.*, 2010).....21
- Figura 4:** Soroprevalência mundial da Toxoplasmose (Adaptado de Pappas *et al.* 2009).....23
- Figura 5:** Forma tripomastigota (A) e amastigota (B) de *Trypanosoma cruzi* em microscopia eletrônica de varredura (Retirado de <http://chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural/>).....28
- Figura 6:** Ciclo biológico do *T. cruzi*. (Adaptado de Pérez-Molina & Molina, 2018).....30
- Figura 7:** Distribuição geográfica aproximada de DTUs de *T. cruzi* em ciclos de transmissão doméstica e silvática (Adaptado de Zingales *et al.* 2012).....31
- Figura 8:** Distribuição espacial da prevalência observada da doença de Chagas em inquéritos de base populacional brasileira (Adaptado de Martins-Melo *et al.*, 2014).....32
- Figura 9:** Efeito citotóxico de Lopinavir em cultura de células NHDF após 7 dias de tratamento. O efeito citotóxico foi avaliado através do ensaio de MTS/PMS, onde Lopinavir apresentou CC<sub>50</sub> na concentração de 21,12 µM ± 1,02. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes e analisados pelo teste one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) (\*P=0,0081).....48
- Figura 10:** (A) Efeito antiproliferativo de Lopinavir em taquizoítos da cepa TgCTBr5 de *T. gondii* em células NHDF, após 24 horas de tratamento. Os resultados são a média de 3 experimentos independentes. \*P = 0,0055, os resultados foram analisados pelo teste one-way ANOVA (Kruskal-Wallis). (B) Células infectadas e não tratadas, células tratadas com 7 µM e 15 µM, pontas das setas indicam células infectadas. As imagens foram obtidas através de lâminas coradas e fotografadas utilizando microscópio óptico de campo claro.....49

**Figura 11:** (A) Efeito antiproliferativo de Lopinavir em taquizoítos da cepa TgCTBr8 de *T. gondii* em células NHDF, após 24 horas de tratamento. As imagens foram obtidas através de lâminas coradas e fotografadas utilizando microscópio óptico de campo claro. Os resultados são a média de 3 experimentos independentes. \*  $P < 0,0098$ , os resultados foram analisados pelo teste one-way ANOVA (Kruskal-Wallis). (B) Células infectadas e não tratadas, células tratadas com 1  $\mu\text{M}$  e 7  $\mu\text{M}$ , pontas das setas indicam células infectadas.....50

**Figura 12:** (A) Efeito antiproliferativo da associação de Sulfadiazina e Pirimetamina em taquizoítos da cepa TgCTBr5 de *T. gondii*, após 24 horas de tratamento, em células NHDF (\* $P=0,0072$ ). (B) Efeito antiproliferativo da associação de Sulfadiazina e Pirimetamina em taquizoítos da cepa TgCTBr8 de *T. gondii*, após 24 horas de tratamento, em células NHDF (\* $P=0,0065$ ). Os resultados são a média de 3 experimentos independentes, os resultados foram analisados pelo teste one-way ANOVA (Kruskal-Wallis).....51

**Figura 13:** As imagens foram obtidas através de lâminas coradas e fotografadas utilizando microscópio óptico de campo claro. (A) Células infectadas e não tratadas, células tratadas com 6,25/0,025  $\mu\text{M}$  e 50/0,2  $\mu\text{M}$ , cepa TgCTBr5. (B) Células infectadas e não tratadas, células tratadas com 6,25/0,025  $\mu\text{M}$  e 100/0,4  $\mu\text{M}$ , cepa TgCTBr8. Pontas das setas indicam células infectadas.....52

**Figura 14:** Efeito antiproliferativo da associação de Sulfadiazina e Pirimetamina com Lopinavir em diferentes concentrações fixas em taquizoítos da cepa TgCTBr5 de *T. gondii*, após 24 horas de tratamento, em células NHDF (LPV 0,625  $\mu\text{M}$  \*  $P=0,0054$ ) (LPV 1,25  $\mu\text{M}$  \*  $P=0,0052$ ). Os resultados são a média de 3 experimentos independentes. Os resultados foram analisados pelo teste one-way ANOVA (Kruskal-Wallis).....53

**Figura 15:** Efeito antiproliferativo da associação de Sulfadiazina e Pirimetamina com Lopinavir em diferentes concentrações fixas em taquizoítos da cepa TgCTBr8 de *T. gondii*, após 24 horas de tratamento, em células NHDF (0,625  $\mu\text{M}$  \* $P=0,0058$ ) (LPV 1,25  $\mu\text{M}$  \*  $P=0,0080$ ). Os resultados são a média de 3 experimentos independentes. Os resultados foram analisados pelo teste one-way ANOVA (Kruskal-Wallis).....54

**Figura 16:** Efeito do pré-tratamento com Lopinavir de taquizoítos de *T. gondii* das cepas TgBTBr5 e TgCTBr8 durante a invasão de células NHDF. Os resultados são a média de 3 experimentos independentes. \*  $P < 0,05$ , os resultados foram analisados pelo teste One-way ANOVA (Kruskal-Wallis).....55

**Figura 17:** Avaliação do potencial cistogênico da cepa TgCTBr5 tratada ou não com Lopinavir, por um período de 24 a 48 horas, em células NHDF. Os resultados são a média de 3 experimentos independentes.  $p > 0,05$ , os resultados foram analisados pelo teste two-way ANOVA.....56

**Figura 18:** Avaliação do potencial cistogênico da cepa TgCTBr8 tratada ou não com Lopinavir, por um período de 24 a 48 horas, em células NHDF. Os resultados são a média de 2 experimentos independentes. (\*  $P < 0,0449$ ), os resultados foram analisados pelo teste two-way ANOVA.....57

**Figura 19:** Representação da fluorescência no ensaio de cistogênese, onde DAPI é o marcador de núcleos tanto das células NHDF quanto de *T. gondii*, SAG-1 marcador da superfície de taquizoítos e DBA marcador de parede cística. (A) Cepa TgCTBr5 com 48 horas

de tratamento na concentração de 8,9  $\mu\text{M}$  de LPV. (B) Cepa TgCTBr8 com 48 horas de tratamento na concentração de 2,1  $\mu\text{M}$  de LPV.....58

**Figura 20:** Cisto de *T. gondii* da cepa TgCTBr8 encontrado em *imprint* de pulmão em camundongo não tratado que não sobreviveu à fase aguda da Toxoplasmose.....59

**Figura 21:** Efeito do tratamento de 10 dias com diferentes doses de LPV/RTV e em associação com SDZ+PYR na sobrevivência de camundongos (n=10 por grupo) suíços fêmeas infectados de forma aguda com  $10^4$  taquizoítos de *T. gondii* (cepa virulenta TgCTBr8) via intraperitoneal. O tratamento teve início 1 dia após infecção. Resultados foram avaliados pelo método Kaplan-Meier e comparados utilizando o log-rank (Mantel-Cox) teste. \*  $P < 0.0001$  vs. não tratado.....60

**Figura 22:** Avaliação do número de cistos cerebrais em camundongos infectados sobreviventes (n=8 de cada grupo) de ensaio agudo (cepa TgCTBr8), 30 dias após o término do tratamento. Análise Mann Whitney test, no qual os resultados não obtiveram diferenças estatísticas significativas entre os grupos. ( $P > 0,05$ ).....60

**Figura 23:** Avaliação de cistos cerebrais em camundongos infectados por via oral com 5 cistos da cepa TgCTBr5, tratamento iniciado após 21 dias de infecção e com duração também de 21 dias. Análise pelo teste one-way ANOVA (Kruskal-Wallis), onde os resultados não obtiveram diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados e o controle ( $P > 0,05$ ).....61

**Figura 24:** Efeito citotóxico de Pritelivir em cultura de células NHDF após 7 dias de tratamento. O efeito citotóxico foi avaliado através do ensaio de MTS/PMS, onde Pritelivir não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes e analisados pelo teste one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) ( $p > 0,05$ ).....62

**Figura 25:** Efeito antiproliferativo de Pritelivir em taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* em células NHDF após 24 e 48 horas de tratamento (24h  $p = 0,0253$ ) (48h  $p = 0,0228$ ). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes e analisados pelo teste One-way ANOVA (Kruskal-Wallis). (B) As imagens foram obtidas através de lâminas coradas e fotografadas utilizando microscópio óptico de campo claro. 24 e 48 horas de tratamento, células não tratadas e tratadas. As pontas das setas indicam células infectadas.....64

**Figura 26:** Efeito antiproliferativo de Pritelivir em amastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em células NHDF após 24 e 48 horas de tratamento (24 h  $p > 0,05$ ) (48 h  $p = 0,0190$ ). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes e analisados pelo teste One-way ANOVA (Kruskal-Wallis).....65

**Figura 27:** Efeito antiproliferativo de Pritelivir em amastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em células NHDF após 24 e 48 horas de tratamento. As imagens foram obtidas através de lâminas marcadas com DAPI e fotografadas utilizando microscópio EVOS. ....66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fórmulas estruturais e moleculares dos inibidores virais, Lopinavir e Pritelivir.....	36
--	----

## LISTA DE ABREVIações

- ANOVA** - Análise de variância
- ASP** - aspartil protease
- BSA** - albumina sérica bovina
- BZN** - benzonidazol
- CC<sub>50</sub>** - concentração citotóxica 50%
- DBA** - lectina *Dolichos biflorus*
- DC** - Doença de Chagas
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- DTU** - Discrete Typing Unit (unidades discretas de tipagem)
- EUA** - Estados Unidos da América
- IC<sub>50</sub>** - concentração inibitória de 50%
- i.p.** - Intra peritoneal
- h** - horas
- HSV** - vírus herpes simplex
- LPV** - lopinavir
- mL** - mililitro
- MTS** - (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio)
- NHDF** - fibroblastos dérmicos humanos normais
- NTX** - nifurtimox
- PBS** - solução salina tamponada com fosfato
- PTV** - pritelivir
- PYR** - pirimetamina
- RTV** - ritonavir
- SDZ** - sulfadiazina
- SFB** - Soro fetal bovino
- SIDA** - síndrome da imunodeficiência adquirida
- SNC** - sistema nervoso central
- TC** - toxoplasmose congênita
- TgCTBr** - *Toxoplasma gondii* toxoplasmose congênita do Brasil
- TO** - toxoplasmose ocular

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	16
1.1 Doenças negligenciadas .....	16
1.2 Protozoários de importância médica foco deste estudo.....	16
1.2.1 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	16
1.2.1.1 Biologia do <i>T. gondii</i> .....	16
1.2.1.2 Toxoplasmose .....	22
1.2.1.3 Fármacos disponíveis e desafios no tratamento da Toxoplasmose .....	25
1.2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	27
1.2.2.1 Biologia do <i>T. cruzi</i> .....	27
1.2.2.2 Doença de Chagas.....	31
1.2.2.3 Tratamentos disponíveis e desafios no tratamento da Doença de Chagas .....	33
2. Inibidores virais: Lopinavir e Pritelivir .....	34
3. Justificativa .....	37
4. Objetivos.....	38
4.1 Objetivo geral.....	38
4.2 Objetivos específicos .....	38
4.2.1 Parte I – Lopinavir .....	38
4.2.2 Parte II - Pritelivir .....	38
5. Materiais e Métodos .....	39
5.1 Cultivo e manutenção de células Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) .....	39
5.2 Manutenção <i>in vitro</i> de parasitos.....	39
5.3 Fármacos.....	40
5.4 Análise do efeito citotóxico em culturas de células dos compostos utilizados.....	40
5.5 Avaliação do efeito antiproliferativo <i>in vitro</i> em <i>T. gondii</i> .....	41
5.6 Ensaio de invasão para <i>T. gondii</i> .....	42
5.7 Interação medicamentosa <i>in vitro</i> .....	42
5.8 Avaliação do potencial cistogênico das cepas TgCTBr8 e TgCTBr5 de <i>T. gondii</i> .....	42
5.9 Avaliação do efeito antiproliferativo <i>in vitro</i> em <i>T. cruzi</i> .....	43
5.10 Ensaio <i>in vivo</i> em <i>T. gondii</i> .....	44
5.10.1 Camundongos e obtenção do parasito.....	44
5.10.2 Modelo agudo de infecção .....	45

5.10.3 Modelo crônico de infecção .....	45
5.10.4 Avaliação dos ensaios <i>in vivo</i> .....	46
5.11 Análise estatística .....	46
6. Resultados .....	47
6.1. Parte I - Lopinavir .....	47
6.1.1 Avaliação da citotoxicidade de Lopinavir em células NHDF .....	47
6.1.2 Avaliação do efeito antiproliferativo <i>in vitro</i> de Lopinavir nas cepas TgCTBr5 e TgCTBr8 de <i>T. gondii</i> .....	48
6.1.3 Avaliação do efeito antiproliferativo <i>in vitro</i> da associação Sulfadiazina e Pirimetamina nas cepas TgCTBr5 e TgCTBr8 de <i>T. gondii</i> .....	51
6.1.4 Avaliação do efeito antiproliferativo <i>in vitro</i> de Lopinavir em associação com Sulfadiazina e Pirimetamina nas cepas TgCTBr8 e TgCTBr5 de <i>T. gondii</i> .....	52
6.1.5 Avaliação da invasão de taquizoítos de <i>T. gondii</i> das cepas TgCTBr5 e TgCTBr8 em células NHDF após pré-tratamento com Lopinavir .....	54
6.1.6 Avaliação do potencial cistogênico das cepas TgCTBr5 e TgCTBr8 de <i>T. gondii</i> mediante o tratamento <i>in vitro</i> com Lopinavir .....	55
6.1.7 Avaliação do efeito de Lopinavir/Ritonavir e em associação com SDZ e PYR na fase aguda da toxoplasmose em modelo murino .....	58
6.1.8 Avaliação do efeito de Lopinavir/Ritonavir na fase crônica da toxoplasmose em modelo murino .....	61
6.2 Parte II - Pritelivir .....	62
6.2.1 Avaliação da citotoxicidade de Pritelivir em células NHDF .....	62
6.2.2 Avaliação do efeito antiproliferativo <i>in vitro</i> de Pritelivir na cepa RH de <i>T. gondii</i> e na cepa Y de <i>T. cruzi</i> .....	63
7. Discussão .....	67
7.1 Lopinavir.....	69
7.2 Pritelivir.....	77
8. Conclusões.....	80
9. Referências .....	81
10. Anexos .....	93
Protocolo CEUA.....	93
Cadastro Sisgen.....	94

# 1. Introdução

## 1.1 Doenças negligenciadas

Doenças negligenciadas são causadas por agentes infecciosos ou parasitas e consideradas endêmicas em populações de baixa renda, principalmente nos países em desenvolvimento. Essas enfermidades também apresentam indicadores inaceitáveis e investimentos reduzidos em pesquisas, produção de medicamentos e em seu controle (Weiss, 2008; Hotez, *et al.*, 2014).

Apesar do progresso alcançado no conhecimento básico de muitas enfermidades e da descoberta de novos compostos para o tratamento, as doenças infecciosas tropicais negligenciadas como, por exemplo, Leishmaniose, Doença de Chagas, Esquistossomose, parasitoses intestinais e a Toxoplasmose, continuam a causar alta morbidade e mortalidade. (Trouiller *et al.*, 2002; Nii-Trebi, 2017).

Por mais que seja necessária a busca pela eficácia, acessibilidade e segurança ao tratamento, o desenvolvimento de medicamentos para as doenças negligenciadas praticamente se estagnou. A falta de interesse da indústria farmacêutica em desenvolver tratamentos para as doenças tropicais, visando substituir terapias ineficazes ou que muitas vezes apresentam alto índice de toxicidade, ou de pesquisas para superar a resistência já existente, se deve principalmente porque não oferecem retornos financeiros suficientes (Trouiller *et al.*, 2002; Nii-Trebi, 2017).

## 1.2 Protozoários de importância médica foco deste estudo

### 1.2.1 *Toxoplasma gondii*

#### 1.2.1.1 Biologia do *T. gondii*

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório, cosmopolita, agente causador da Toxoplasmose. Pertencente ao filo Apicomplexa, todos os representantes deste filo são parasitos obrigatórios e caracterizados por possuir em determinada fase de vida, uma estrutura chamada complexo apical, que se localiza na região anterior e é envolvida na fixação e penetração nas células dos hospedeiros (Souza, 1974). Este filo compreende também outros protozoários de importância médica e veterinária, como *Plasmodium spp.*, *Eimeria* ,

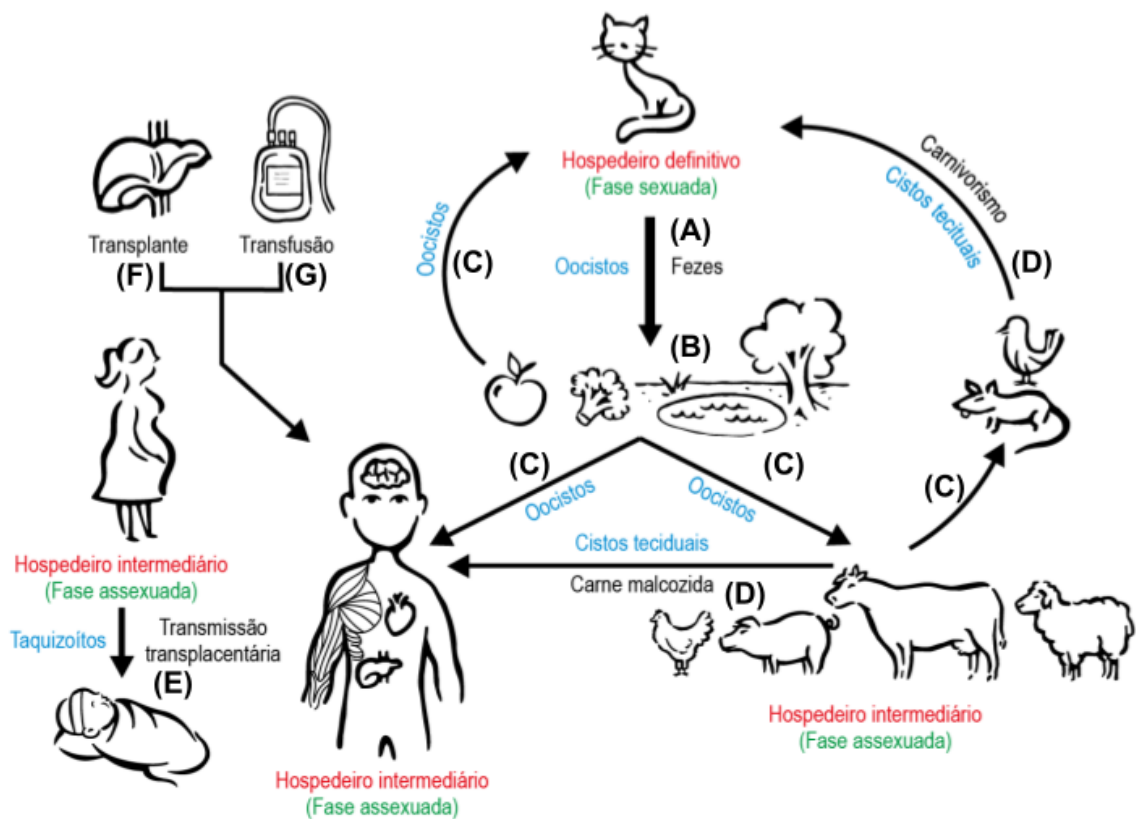
*Neospora*, *Babesia*, *Theileria* e *Cryptosporidium*. Foi observado pela primeira vez em 1908 por Nicolle e Manceaux nos tecidos do roedor *Ctenodoactylus gundi* e no Brasil por Splendore em tecidos de um coelho (Weiss & Dubey, 2009). O ciclo de vida de *T. gondii* (Figura 1) apresenta uma fase assexuada, que se passa virtualmente em qualquer animal homeotérmico, e uma fase sexuada, que se passa somente nos felídeos. *T. gondii* possui como formas infectantes os taquizoítos, bradizoítos (contidos nos cistos teciduais) e os esporozoítos (presentes nos oocistos).

Os taquizoítos (Figura 2A) possuem forma alongada apresentando a região anterior afilada e a região posterior arredondada. Medem aproximadamente 8 µm de comprimento por 2 µm de largura. Na porção apical do parasito estão localizadas organelas secretoras especializadas, tais como róptrias, micronemas, além de estruturas do citoesqueleto como conóide, anel polar e anéis apicais, envolvidos no direcionamento das organelas de secreção e também como suporte a integridade estrutural do parasito (Morissette & Sibley, 2002). Apresentam o núcleo na porção mediana do parasito e outras organelas como acidocalcissomos, relacionados à regulação de cálcio, regulação de pH e osmorregulação, grânulos densos, importante na formação do vacúolo parasitóforo e corpos lipídicos que são formados durante a aquisição de lipídios pelo parasito dentro da célula hospedeira (Charron & Sibley, 2002). E ainda duas organelas endossimbiontes, uma única mitocôndria e o apicoplasto, organela exclusiva do filo Apicomplexa, que se classifica como um plastídeo, mas perdeu sua capacidade fotossintética e tem como algumas funções a síntese de RNA e DNA e a biossíntese de ácidos graxos e de síntese de isoprenóides (Waller *et al.*, 2003).

Os taquizoítos estão presentes durante a infecção aguda, como parte do ciclo assexuado e se replicam de forma rápida a cada 6 a 8 horas em um processo denominado endodiogenia dentro de um compartimento intracelular denominado vacúolo parasitóforo. Este vacúolo evita a fusão com a via endossomal da célula hospedeira e é essencial para o crescimento intracelular do parasita. Os taquizoítos são capazes de infectar todo tipo de célula nucleada e se espalham por todo o corpo a partir do sítio inicial de infecção. Essas formas têm importância na transmissão vertical durante a gestação. Em hospedeiros imunocompetentes, a maioria dos taquizoítos são eliminados pelo sistema imunológico, dentro de algumas semanas após infecção aguda, sofrendo supressão do sistema imune, se convertem às formas bradizoítos, que formam os cistos teciduais. (Montoya & Liesenfeld, 2004; Halonen & Weiss, 2013).

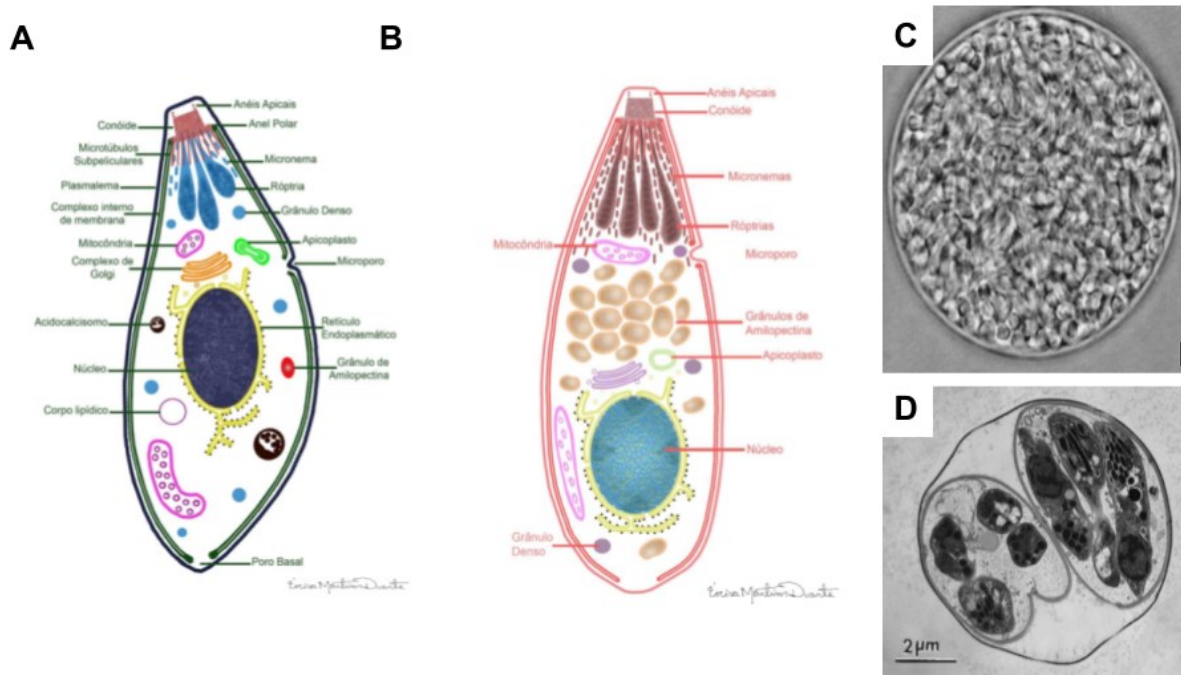
Os bradizoítos (Figura 2B), outro estágio do ciclo assexuado, se desenvolvem dentro de cistos teciduais, que são formados por uma parede cística que consiste na modificação do vacúolo parasitóforo pelo parasito (Figura 2C), e são normalmente encontrados em células do cérebro, músculos esqueléticos e cardíacos, podendo permanecer nestas por toda a vida do hospedeiro. Os bradizoítos, se multiplicam lentamente, são menores em relação aos taquizoítos medindo cerca de 7  $\mu\text{m}$  por 1,5  $\mu\text{m}$ , possuem o núcleo localizado na região posterior, róptrias mais densas, numerosos micronemas e uma grande quantidade de grânulos de amilopectina distribuídos pelo citoplasma, que servem como grandes reservas energéticas para o parasito. Por serem resistentes às enzimas digestivas, são obtidos através do consumo de carne crua ou mal cozida de animais infectados. Os bradizoítos podem ser liberados dos cistos e se transformar novamente em taquizoítos, e causam recrudescência da infecção em pacientes imunocomprometidos (Montoya & Liesenfeld, 2004; Weiss & Dubey, 2009).

Os felídeos são os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, sendo o gato doméstico o mais importante do ponto de vista epidemiológico para os humanos. No interior do intestino delgado dos felídeos ocorre a reprodução sexuada do protozoário, dando origem a milhares de oocistos que são eliminados juntamente com as fezes. (Figura 2D). O oocisto é a forma infectante resistente no ambiente, neles estão contidos os esporozoítos, que ao serem ingeridos por aves e mamíferos darão origem aos taquizoítos no intestino delgado, que é o sítio inicial de infecção após a ingestão (Montoya & Liesenfeld, 2004).



**Figura 1:** Ciclo Biológico do *Toxoplasma gondii*. (A) Eliminação de oocistos não esporulados por felídeos infectados após gametogênese e formação de um oocisto, após esporulação no ambiente se tornam infecciosos; (B) Oocistos esporulados no ambiente contaminam o solo, água e alimentos e (C) São ingeridos por outros felídeos ou pelos hospedeiros intermediários (homem, aves, gado, etc.), causando infecção aguda seguida de formação de cistos teciduais; (D) Transmissão através da ingestão de cistos teciduais (predação ou alimentação); (E) Transmissão transplacentária durante infecção aguda; (F) Transmissão através de transfusão sanguínea; (G) Transplante de órgãos com cistos tissulares. (Retirado de Lara *et al.*, 2017).

A transmissão de *T. gondii* através do transplante de órgãos, embora mais raro, também pode ocorrer em pacientes transplantados cardíacos, pulmonares, renais e hepáticos (Brooks & Remington, 1986; Israelski & Remington, 1993; Tenter *et al.*, 2000).

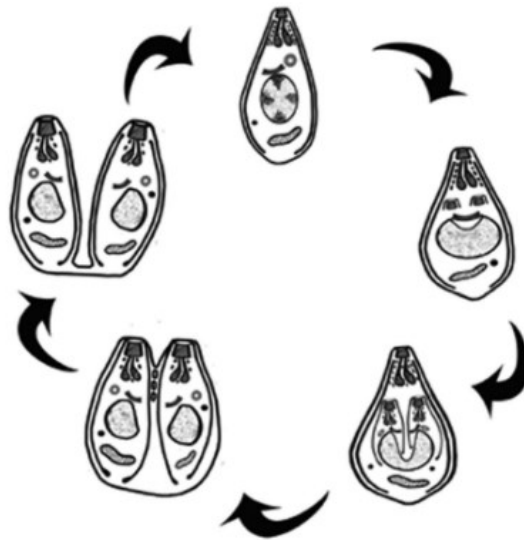


**Figura 2:** Estágios infectantes de *T. gondii*. (A) Desenho esquemático de um taquizoíto (Retirado de Souza *et al.*, 2010) (B) Desenho esquemático de um bradizoíto (Retirado de Martins-Duarte, 2011). (C) Cisto tecidual. (D) Oocisto (Retirados de Dubey *et al.* 1998).

*T. gondii* é capaz de infectar qualquer célula nucleada de aves e mamíferos. A primeira etapa é o processo de invasão, onde é necessário que ocorra o reconhecimento celular e a adesão. Através de proteínas secretadas pelos micronemas e róptrias ocorre a formação temporária da junção móvel, que dá suporte para que ocorra a internalização ativa por gliding. À medida que o *T. gondii* penetra na membrana da célula hospedeira forma-se o vacúolo parasitóforo, que não se funde com lisossomos da célula. O vacúolo parasitóforo é formado pela invaginação da membrana do hospedeiro, mas tem composição diferente, pois se incorpora de proteínas secretadas pelos grânulos densos do parasito (de Souza *et al.*, 2010; Horta *et al.*, 2020)

No interior do vacúolo, o parasito inicia a sua replicação pelo processo de divisão celular chamado de endodiogenia (Figura 3), onde células-filhas são formadas no interior de uma célula-mãe que é descartada ao final da divisão (de Souza *et al.*, 2010). Durante a multiplicação e aumento do vacúolo, os grânulos densos secretam proteínas que farão parte da rede intravacuolar, que sustenta e estabiliza os taquizoítos dentro do vacúolo parasitóforo e elementos da célula hospedeira, como retículo endoplasmático rugoso, filamentos do citoesqueleto e até mitocôndrias se dispõem ao redor destes e conferem a nutrição e suporte

ao crescimento do vacúolo (Attias *et al.*, 2019). Várias dessas proteínas modificam a membrana do vacúolo parasitóforo, formando poros, o que permite a difusão de moléculas de até 1.2 kDa, entre o vacúolo e o citoplasma da célula hospedeira (Schwab *et al.*, 1994). Após vários ciclos de divisão, ocorre o egresso dos parasitos do vacúolo e ruptura celular, liberando os taquizoítos para uma nova infecção (Attias *et al.*, 2019; Horta *et al.*, 2020).



**Figura 3:** Diagrama simplificado do processo de divisão do *T. gondii* por endodiogenia (Retirado de Souza *et al.*, 2010).

*T. gondii* possui três linhagens clonais predominantes no Hemisfério Norte, denominadas cepas do tipo I, II e II. A virulência está diretamente associada à patogenicidade do *T. gondii*, em como as diferentes cepas se comportam em relação à migração, crescimento e modulação do sistema imune. A classificação da virulência das cepas são determinadas através da dose letal em modelo murino, onde 100% de mortalidade (LD100) utilizando menos que  $10^3$  taquizoítos são consideradas virulentas, dose letal com inóculo maior que  $10^3$  consideradas avirulentas e isolados entre estes dois extremos são classificadas como de virulência intermediária (Howe & Sibley, 1995).

No hemisfério norte a cepa tipo II, como a ME49, é responsável por cerca de 2/3 de casos de Toxoplasmose e está frequentemente associada a reativação de infecções crônicas em 65% de casos de pacientes com SIDA. Já a cepa tipo I, RH, está mais relacionada com casos de Toxoplasmose Congênita (TC) e cepas do tipo III são principalmente isoladas em animais (Howe & Sibley, 1995; Montoya & Liesenfeld, 2004; Saeij *et al.*, 2005).

No entanto, estudos moleculares de isolados de *T. gondii* obtidos de animais e de humanos da América do Sul e, principalmente, do Brasil têm mostrado distinção entre a estrutura genética das cepas clonais encontradas no hemisfério norte (Ferreira *et al.* 2006; Pena *et al.* 2008). Os isolados do hemisfério sul, são denominados atípicos, pois apresentam alelos distintos das cepas clonais, para os mesmos segmentos de DNA (Dardé, 2008). Acredita-se que devido à ampla biodiversidade da fauna brasileira, amplitude geográfica e diferentes rotas de infecção contribuem para ela elevada variabilidade genética das cepas de *T. gondii* no Brasil (Ferreira *et al.*, 2006).

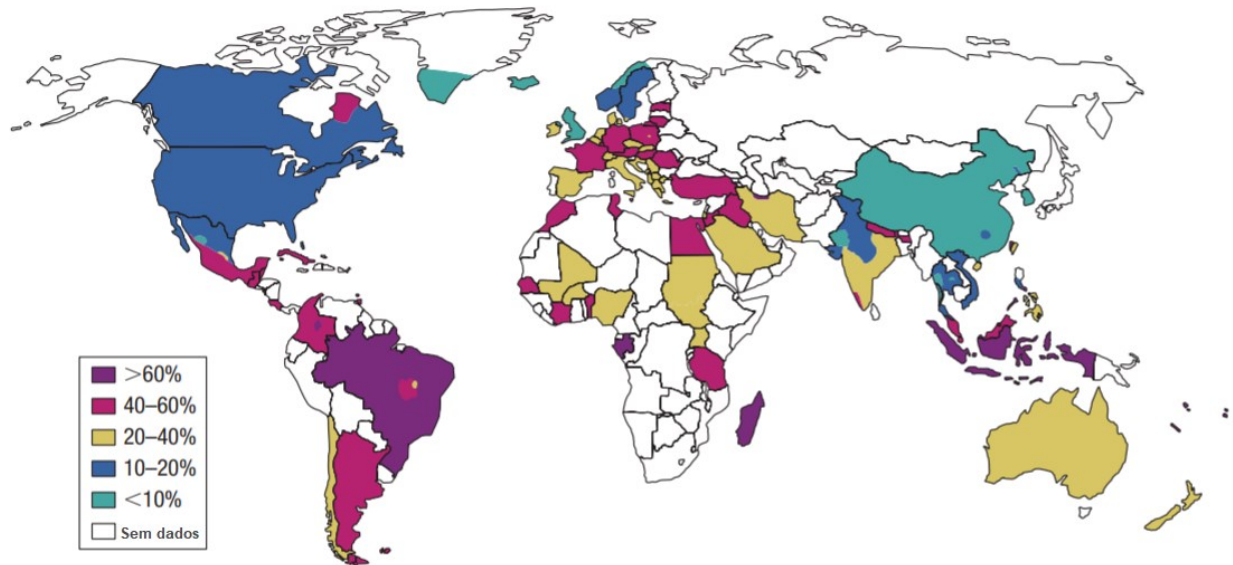
Utilizando marcadores de segmentos polimórficos de DNA propostos por Su *et al.* (2006), foi observado por Pena *et al.* (2008) uma alta diversidade genética nas amostras e foram propostas quatro linhagens clonais brasileiras. Essas linhagens foram denominadas tipos BrI, BrII, BrIII e BrIV. A análise da letalidade em camundongos infectados demonstrou que o Tipo BrI é altamente virulento, o Tipo BrIII não é virulento, enquanto as linhagens Tipo BrII e BrIV são de virulência intermediária (Pena *et al.* 2008; Dubey *et al.*, 2012).

Pouco se sabe da associação de virulência com genótipos atípicos encontrados na América do Sul, mas é observado um agravamento nos casos de Toxoplasmose no Brasil (Gilbert, 2009). Carneiro *et al.* (2013) em estudo com 27 amostras obtidas de Toxoplasmose Congênita (TC), cepas virulentas foram isoladas de recém-nascidos com toxoplasmose grave e avirulentas de crianças assintomáticas, o que sugere alguma correspondência entre virulência em camundongos e doença em humanos. Mas o estudo não apresentou associação estatística entre virulência ou genótipo da cepa com sintomatologia nas crianças.

### 1.2.1.2 Toxoplasmose

Estima-se que 30% da população mundial esteja infectada com o *T. gondii*, mas este índice pode variar dependendo da região (Montoya & Liesenfeld, 2004; Dubey *et al.*, 2012), no Brasil a prevalência varia de 50-80% na população adulta (Figura 4) (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003; Pappas *et al.*, 2009). A infecção por *T. gondii* na maioria dos casos é assintomática, sendo que as manifestações clínicas dependem do estado imunológico do indivíduo e do quadro clínico. A infecção crônica também vem sendo sugerida como possível responsável por alterações de comportamento e personalidade, aumento de risco de esquizofrenia, depressão, suicídio e outros transtornos psiquiátricos, mas ainda são necessárias pesquisas para explorar os mecanismos subjacentes de *T. gondii* na patogênese dessas doenças e a

possibilidade de uma relação causal (Montoya & Liesenfeld, 2004; Arling *et al.*, 2009; Flegr, 2013).



**Figura 4:** Soroprevalência mundial da Toxoplasmose (Adaptado de Pappas *et al.* 2009).

Em indivíduos imunocompetentes, 80-90% dos casos de toxoplasmose adquirida são assintomáticos. Pacientes com sinais clínicos apresentam linfadenopatia na região da cabeça e pescoço; embora também possam ocorrer apresentações envolvendo linfonodos inguinais, retroperitoneais e mesentéricos, podendo ser acompanhada de febre, mal-estar, dor de garganta e cefaleia, na maioria das vezes o curso da doença é autolimitante. Após 2 a 3 semanas de infecção, devido à eficiência do sistema imune do indivíduo, taquizoítos são eliminados e alguns se diferenciam em bradizoítos, permanecendo como cistos, principalmente em tecidos neurais e musculares, pela vida inteira do hospedeiro (Luft & Remington, 1992; Montoya & Liesenfeld, 2004; Halonen & Weiss, 2013).

Pacientes imunocomprometidos, incluindo aqueles em tratamento com corticosteróides ou fármacos citotóxicos, pacientes com neoplasias hematológicas, transplantes de órgãos ou portadores do HIV, têm alto risco de encefalite ou infecções disseminadas. A toxoplasmose geralmente ocorre devido à reativação da infecção, e em casos de transplantes de órgãos de doadores positivos e receptores negativos, o receptor pode desenvolver a infecção aguda adquirida, geralmente fatal se não tratada, e estima-se um índice próximo a 90% de mortalidade (Luft & Remington, 1992; Israelski & Remington, 1993; Montoya *et al.*, 2001).

A toxoplasmose congênita (TC), na qual há passagem do taquizoíto via transplacentária da mãe para o feto, pode ocorrer através de uma primo-infecção, devido a reativação da infecção latente, como a coinfeção com o HIV, e mais raramente, porém descrito, devido a reinfeção de gestantes já cronicamente infectadas com uma cepa de um genótipo distinto da primeira infecção (Fortier *et al.*, 1991; Araújo *et al.* 1997; Gavinet *et al.*, 1997; Hennequin *et al.* 1997; Silveira *et al.*, 2003; Kodjikian *et al.*, 2004; Lebas *et al.*, 2004; Elbez-Rubinstein *et al.*, 2009). A TC pode se apresentar subclínica e as manifestações clínicas, se presentes, incluem prematuridade, restrição de crescimento intra-uterino, icterícia, hepatoesplenomegalia, miocardite, pneumonite, púrpura, coriorretinite (em 70-80% dos casos), hidrocefalia, calcificações intracranianas, microcefalia, convulsões, retardo mental, cegueira e epilepsia (Mohanty *et al.*, 2012).

A prevalência mundial para TC é de 1 para 10000 nascimentos. No Brasil, é considerado 5 vezes maior o risco de se infectar congenitamente e com lesões mais severas do que na Europa e acreditam estar relacionado com a variabilidade das cepas encontradas no país (Gilbert *et al.*, 2008; The Syrocot, 2007). A prevalência em território nacional para TC é de 0,5-2,3 casos a cada 1000 nascidos vivos, no estado de Minas Gerais os casos chegam a 3/1000, no interior do estado, na região do Macro Jequitinhonha a mais alta prevalência do estado é de 1 caso para cada 361 nascidos (Neto *et al.*, 2010; Dubey *et al.*, 2012; Carellos *et al.*, 2014). Em estudos de morbidade, as crianças apresentam ou irão apresentar ao longo de suas vidas aproximadamente: 35% doenças neurológicas, incluindo hidrocefalia, microcefalia e retardo mental, 80% lesões oculares, 40% perda auditiva, além de morte logo após o nascimento (Stella, 2004; Vasconcelos-Santos *et al.*, 2009).

Sem tratamento, a incidência de infecção fetal é de 10% a 15% durante o primeiro trimestre, 30% para o segundo trimestre e 60% para o terceiro trimestre (Khan *et al.*, 2018). A frequência da transmissão e a gravidade da doença estão inversamente relacionadas. A infecção precoce da mãe (primeiro e segundo trimestre) pode resultar em TC severa e até resultar na morte do feto e aborto espontâneo, já a infecção materna tardia (terceiro trimestre) geralmente resulta em recém-nascidos com aparência normal, podendo passar por uma infecção subclínica e se não tratados mais tarde podem desenvolver coriorretinite ou retardo mental (Vogel *et al.*, 1996; Dunn *et al.*, 1999; Montoya & Liesenfeld, 2004).

A toxoplasmose ocular (TO) pode ser congênita ou adquirida, e é a manifestação sintomática mais comum da infecção aguda pós-natal ou reativação da doença em

indivíduos imunocomprometidos. O parasita se multiplica na retina e ocorre subsequentes inflamações principalmente da coróide, chamada retinocoroidite ou coroidite, causando cicatrização. A retinocoroidite toxoplásmica é a causa mais frequente de cegueira infecciosa e problemas visuais entre crianças nos países em desenvolvimento. (Holland, 2003; Jones *et al.*, 2006; Garweg & Candolfi, 2009).

A prevalência da TO adquirida é bem menor em relação à obtida pelo desenvolvimento da toxoplasmose congênita, por exemplo, nos Estados Unidos não ultrapassa os 2%. No Brasil, ao contrário do que acontece na América do Norte, a prevalência dos casos de TO adquirida é alta, chegando aos 18%, essa prevalência mais alta foi atribuída à infecção por genótipos de parasitas mais virulentos (Silveira *et al.*, 1988; Glasner *et al.*, 1992; Holland, 2003; Dubey *et al.*, 2012).

### **1.2.1.3 Fármacos disponíveis e desafios no tratamento da Toxoplasmose**

Em 1953, foi observado que a sulfadiazina (SDZ) e a pirimetamina (PYR) utilizadas em associação são sinérgicas, ou seja, a interação entre elas aumenta de forma significativa seus efeitos anti-*Toxoplasma* (Eyles & Coleman, 1954). Estes fármacos agem bloqueando o metabolismo do ácido fólico, inibindo as enzimas diidrofolato redutase (PYR) e diidropteroato sintetase (SDZ). Os compostos de folato são co-fatores essenciais para diversas etapas metabólicas críticas, incluindo a formação de aminoácidos e nucleotídeos de timidina e por isso a inibição da via do ácido fólico afeta a proliferação parasitária. (Allegra *et al.*, 1990; Kortagere, 2012). A realização do tratamento utilizando o regime com SDZ e PYR é associada a inúmeros efeitos adversos, o que causa abandono do tratamento por alguns pacientes (Luft & Remington, 1992).

A administração da SDZ tem efeitos adversos relacionados à cristalúria, que resulta em nefrotoxicidade; as reações de hipersensibilidade como urticária, angioedema e síndrome de Stevens-Johnson; os distúrbios hematopoiéticos, podendo ocorrer também a granulocitopenia e trombocitopenia (Montoya & Remington, 2008; Montazeri *et al.*, 2017). Em recém-nascidos pode-se desenvolver icterícia nuclear (síndrome Kernicterus) uma vez que a SDZ desloca a bilirrubina dos locais de ligação na albumina sérica, ficando livre para entrar no sistema nervoso central, através da barreira hematoencefálica ainda não completamente desenvolvida (Eyles & Coleman, 1955).

PYR em altas doses, pode causar supressão medular, podendo se manifestar como anemia megaloblástica, alterações hematológicas, leucopenia, trombocitopenia, pancitopenia, reações de hipersensibilidade e também aumentam o risco de cálculos renais (Montoya & Remington, 2008; Montazeri *et al.*, 2017).

Em imunocompetentes, na maioria das vezes a infecção é assintomática. Em casos moderados a grave, a terapia é realizada com SDZ + PYR, suplementada de ácido fólico por 2- 4 semanas, esse regime de tratamento também é utilizado para TO em adultos, sendo avaliada a necessidade de tratamento e ainda se sugere a combinação com corticoides dependendo da evolução clínica do comprometimento ocular (Montoya & Liesenfeld, 2004; Halonen & Weiss, 2013).

Em 1958, Garin & Eyles identificaram ação anti-*Toxoplasma* da espiramicina, um antibiótico macrolídeo. Estudos demonstram que a terapia realizada com espiramicina reduz a transmissão para o feto (Beverley, 1973), e como não é capaz de ultrapassar a barreira transplacentária, evita assim qualquer possibilidade de efeito teratogênico no primeiro trimestre da gravidez. Mas por este mesmo motivo não é eficaz para o tratamento do feto (Couvreur *et al.*, 1988).

Em mulheres grávidas infectadas agudamente, o tratamento é realizado imediatamente. No Brasil até a 18ª semana a espiramicina é utilizada, se após este período for detectada a transmissão da infecção para o feto, a terapia é realizada com sulfadiazina + pirimetamina, até o nascimento e suplementada com ácido fólico até 1 mês após o parto (Montoya & Liesenfeld, 2004; Konstantinovic *et al.*, 2019). Se confirmada a toxoplasmose congênita, o tratamento pós-natal é realizado com corticoides, SDZ + PYR suplementada com ácido fólico, com duração de pelo menos um ano (Montoya & Liesenfeld, 2004, Halonen & Weiss, 2013; Konstantinovic *et al.*, 2019).

Vários estudos foram conduzidos e verificaram a ação anti-*Toxoplasma*, através da monoterapia ou combinação entre: sulfonamidas, pirimetamina, dapsona, clindamicina, atovaquona, tetraciclina, rifamicina, lincomicina, trimetoprima e os macrolídeos, claritromicina e azitromicina (Beverley, 1957; Montoya & Remington, 2008; Kortagere, 2012; Montazeri, 2017; Dunay *et al.*, 2018).

Em pacientes imunossuprimidos, a profilaxia normalmente é realizada utilizando Sulfametoxazol + Trimetoprima, e para o tratamento é utilizada a combinação SDZ+ PYRa, e

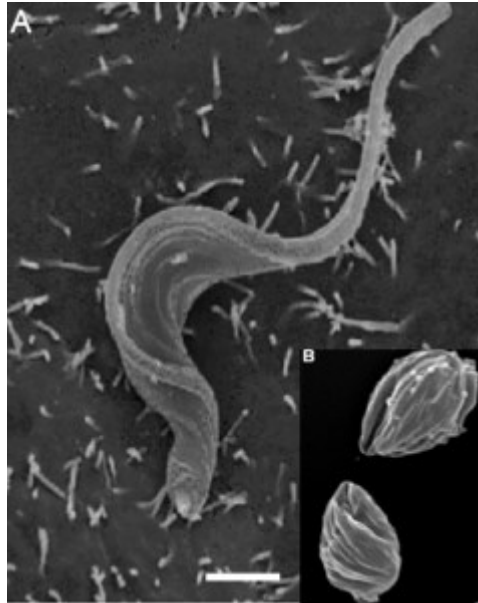
como alternativa à sulfadiazina, por conta dos diversos efeitos adversos, são utilizadas, por exemplo, a clindamicina, azitromicina e a atovaquona (Montoya & Liesenfeld, 2004; Halonen & Weiss, 2013; Konstantinovic *et al.*, 2019).

Mas apesar dos inúmeros fármacos disponíveis hoje para o tratamento da Toxoplasmose, é necessária a busca de terapias seguras para o uso no tratamento da gestante e do feto, que tenha ausência ou diminuição dos efeitos adversos para os pacientes e que tenha uma ação efetiva contra a forma latente da doença, os cistos, o que preveniria uma reativação em pacientes imunossuprimidos (Kortagere, 2012; Montazeri, 2017; Dunay *et al.*, 2018).

## 1.2.2 *Trypanosoma cruzi*

### 1.2.2.1 Biologia do *T. cruzi*

*Trypanosoma cruzi* é um protozoário da ordem Kinetoplastida, e família Trypanosomatidae, mesma família que pertence outro protozoário de importância médica, o gênero *Leishmania spp.*, agente etiológico da Leishmaniose, que se caracteriza pela presença de flagelo único e o cinetoplasto, que é uma região específica da mitocôndria onde está concentrado o DNA mitocondrial, o kDNA (Rassi *et al.*, 2010). Foi descoberto pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909, no Brasil, e é causador da Tripanossomíase Americana, mais conhecida como Doença de Chagas (DC) (Chagas, 2009). *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida heteroxênico, isto é, apresenta tanto um hospedeiro vertebrado, mamíferos em geral, incluindo o homem, quanto um hospedeiro invertebrado, insetos hemípteros da Família Reduviidae e subfamília Triatominae, os triatomíneos (Rassi *et al.*, 2010). Possui duas formas evolutivas em seres humanos, a tripomastigota (Figura 5A), com flagelo único que se estende ao longo da borda externa de uma membrana ondulada e que não se prolifera no sangue, mas é capaz de ser transportada para todo o organismo. Já a forma amastigota (Figura 5B), possui flagelo internalizado, é intracelular e é o estágio proliferativo no vertebrado (Perez-Molina & Molina, 2018; Echeverria & Morillo, 2019).



**Figura 5:** Forma tripomastigota (A) e amastigota (B) de *Trypanosoma cruzi* em microscopia eletrônica de varredura (Retirado de <http://chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural/>).

A interação entre células hospedeiras e *T. cruzi* pode ser dividida em três fases: adesão (reconhecimento de moléculas específicas do parasito pela célula hospedeira), sinalização e internalização (de Souza *et al.*, 2010). Moléculas de superfície do parasita, ao interagirem com moléculas de superfície das células hospedeiras, são responsáveis pelos processos de interação e invasão. São exemplos dessas moléculas: mucinas, transialidases, polissacarídeos, glicoproteínas e lipídios ancorados ao fosfatidilinositol na membrana, além de outras proteínas integrais da membrana do parasito (Villalta *et al.*, 2009).

O parasita faz uso de diversas estratégias utilizando mecanismos diferentes da célula hospedeira para infectá-la. As formas de invasão conhecidas são o mecanismo de fagocitose e macropinocitose, endocitose mediada por microdomínios de membrana (flotilins e caveolins) e endocitose mediada por clatrina, penetração ativa e através de mecanismo de reparo de membrana plasmática do hospedeiro (Barrias *et al.*, 2013).

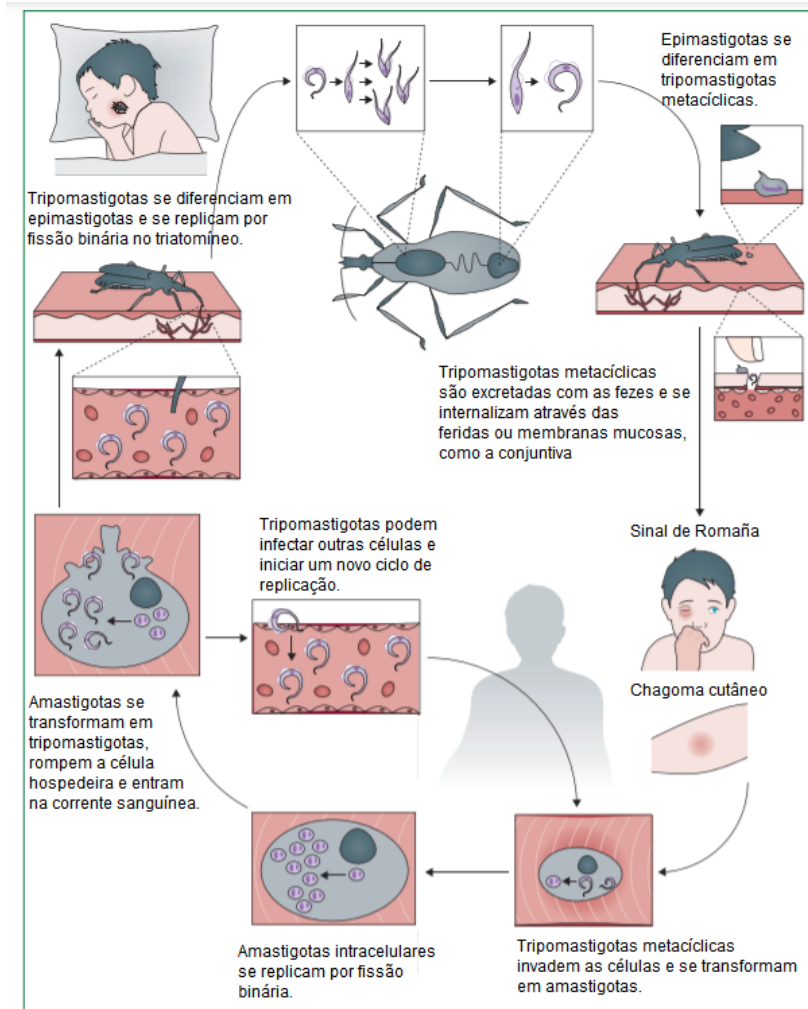
Durante a adesão do parasito ocorre um aumento transitório de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, em 20% dos parasitos que invadem a célula hospedeira, ocorre através de via dependente de lisossomos que envolve recrutamento de lisossomos para o local da infecção através da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. A tripomastigota é então contida em vacúolo formado por membrana lisossomal. Alternativamente, tem-se a via independente de lisossomos, na qual tripomastigotas penetram a célula por invaginações na membrana plasmática, na qual a fusão lisossomal acontece internamente tardiamente na célula hospedeira e não no ponto de adesão à superfície celular (de Souza *et al.*, 2010). A formação do vacúolo parasitóforo é dependente

da fusão com lisossomos (Andrade & Andrews, 2004), a fusão lisossomal é essencial para o sucesso da infecção, pois o mecanismo de escape do vacúolo parasitóforo é do meio ácido presente no lisossomo (Andrews, 1994).

Este vacúolo é chamado de transitório, pois após cerca de 2 horas, o parasita destrói a membrana deste, através da secreção de enzimas que induzem a formação de poros. Durante este processo, as tripomastigotas começam a diferenciar-se para a forma amastigota. Após o escape do vacúolo, o processo de diferenciação para amastigota é finalizado no citoplasma que é também o local onde se proliferam de forma síncrona, com um tempo de geração que varia de acordo com a cepa de *T. cruzi* (Perez-Molina & Molina, 2018; Horta *et al.*, 2020)

Após intensa replicação, amastigotas iniciam a diferenciação para a forma tripomastigota sanguínea, que causam a ruptura celular liberando os tripomastigotas que podem invadir células adjacentes ou retornar a circulação sanguínea, neste caso estarão disponíveis para a infecção do vetor (Rodríguez *et al.*, 1996; Rassi *et al.*, 2010; Perez-Molina & Molina, 2018; Salassa *et al.*, 2019; Horta *et al.*, 2020). Estudos recentes demonstram que amastigotas eliminadas precocemente durante a ruptura celular (amastigotas extracelulares) também podem infectar células, induzindo a fagocitose mesmo em células fagocíticas não profissionais (Fernandes *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2019).

Após repasto sanguíneo realizado no hospedeiro vertebrado, as tripomastigotas sanguíneas se diferenciam em epimastigotas no tubo digestivo do triatomíneo, onde realizam a sua replicação, estas se direcionam para a porção terminal do intestino do vetor, e se convertem a tripomastigotas metacíclicas infecciosas, que são excretadas pela fezes e ao entrarem em contato com a ferida ou mucosas do hospedeiro vertebrado ganham a corrente sanguínea e iniciam o processo de invasão em qualquer célula nucleada (Figura 6)(Pérez-Molina & Molina, 2018).

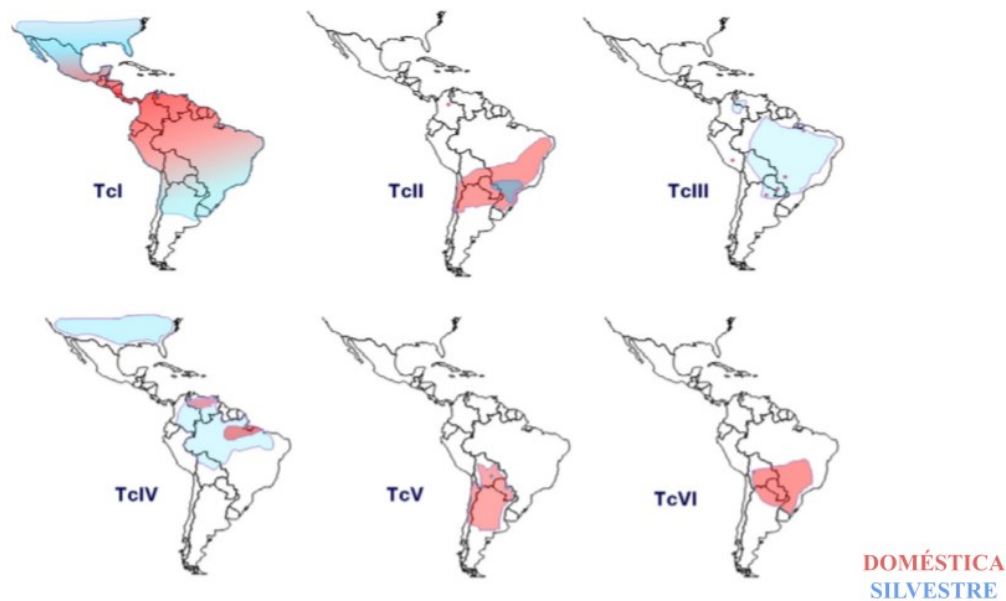


**Figura 6:** Ciclo biológico do *T. cruzi*. (Adaptado de Pérez-Molina & Molina, 2018).

O principal mecanismo de transmissão em áreas endêmicas continua sendo a vetorial, mas em áreas não endêmicas a transmissão através da contaminação dos alimentos com triatomíneos infectados, da transfusão sanguínea, transplacentária, transplante de órgãos, compartilhamento de seringas e acidentes laboratoriais são importantes vias e há estudos que demonstraram experimentalmente em modelo murino a viabilidade da transmissão por via sexual com observação de sorologia positivas em fêmeas negativas antes do acasalamento e a presença de amastigotas nos testículos dos machos, sendo esta uma via também possível (Cordova *et al.*, 2010; Staquicini *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2011; Morillo, 2013; Angheben, 2015; Ribeiro *et al.*, 2016; Rios *et al.*, 2018; Echeverria & Morillo, 2019).

*T. cruzi* apresenta um modelo de evolução predominante clonal, o termo DTU (*Discrete Typing Units*) foi proposto para descrever conjuntos de cepas que são geneticamente mais semelhantes entre si, onde encontramos as linhagens TcI - TcVI e Tcbat. Podem ser

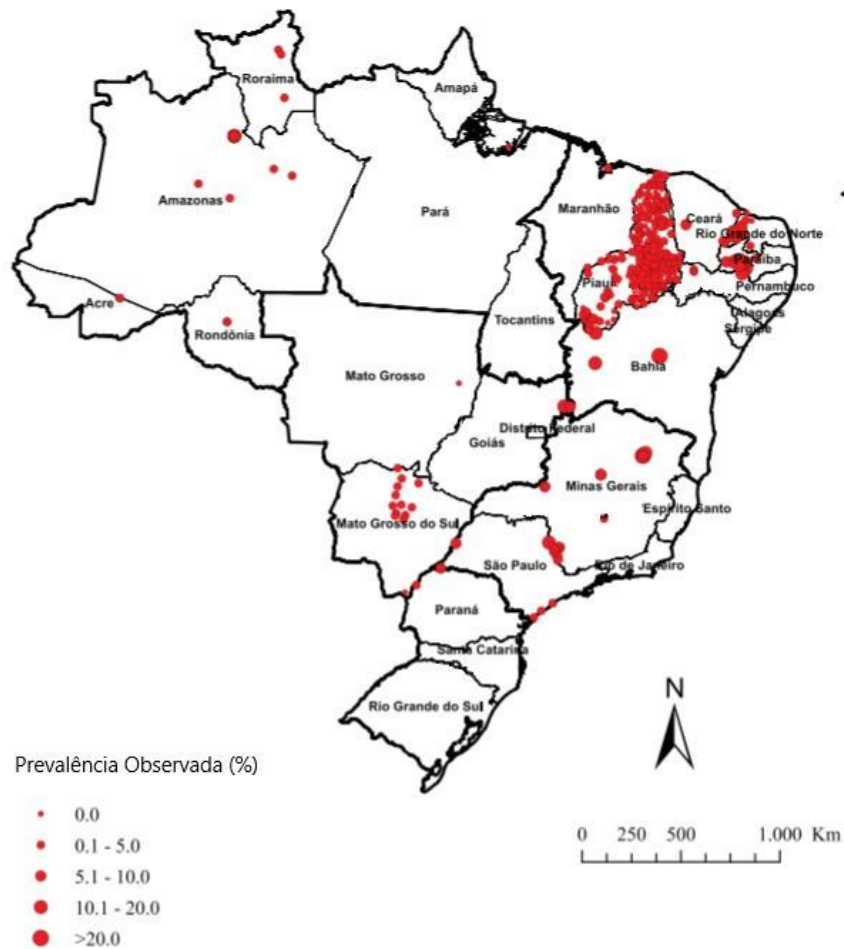
classificadas quanto a sua distribuição geográfica e participação nos ciclos domésticos e silvestres (Figura 7) (Zingales *et al.*, 2012).



**Figura 7:** Distribuição geográfica aproximada de DTUs de *T. cruzi* em ciclos de transmissão doméstica e silvática (Adaptado de Zingales *et al.* 2012).

### 1.2.2.2 Doença de Chagas

Estima-se que aproximadamente, 8 milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde a DC continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública, causando incapacidade em indivíduos infectados e mais de 10.000 mortes por ano (WHO, 2009). No Brasil, atualmente, há pelo menos um milhão de pessoas infectadas por *T. cruzi*, soma-se a este número a ocorrência de casos e surtos por transmissão oral pela ingestão de alimentos contaminados, em 2020, foram confirmados 146 casos no Brasil, (BRASIL, 2021). Sendo a região nordeste a de maior prevalência da doença no país (Figura 8) (Martins-Melo *et al.*, 2014). Minas Gerais, entre março e agosto de 2020 obteve um total de 395 óbitos em pacientes acometidos pela DC, atrás apenas do estado de São Paulo (BRASIL, 2021).



**Figura 8:** Distribuição espacial da prevalência observada da doença de Chagas em inquéritos de base populacional brasileira (Adaptado de Martins-Melo *et al.*, 2014).

A doença de Chagas (DC) é uma desordem multissistêmica e pode afetar os sistemas cardiovascular, digestivo e o sistema nervoso central. Caracteriza-se por duas fases, aguda e crônica. A fase aguda inclui como manifestações, caso transmissão vetorial, o sinal de Romaña (edema unilateral, indolor na região das pálpebras), mas sintomas sistêmicos da DC aguda são raros e incluem febre moderada, mal-estar, cefaleia, anorexia, diarreia, mialgia, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, edema generalizado ou local (em membros ou face), erupção cutânea, manifestações hemorrágicas, icterícia, miocardite, taquicardia, arritmias, bloqueio atrioventricular e em um pequeno percentual, meningoencefalite (Carlier *et al.*, 2011; Bocchi *et al.*, 2017; Echeverria & Morillo, 2019).

Cerca de 30% dos pacientes infectados entram no estágio crônico, estima-se que o envolvimento cardíaco é o mais frequente e grave envolvimento de órgão, ocorrendo entre 14 a 45% dos pacientes (Carlier *et al.*, 2011; Bocchi *et al.*, 2017; Pérez-Molina & Molina, 2018).

Alterações digestivas são causadas pela desnervação dos órgãos e resultam em distúrbios na absorção, motilidade e secreção, causando a formação, principalmente, de megacólon e megaesôfago. A infecção congênita pode ser assintomática ou leve, com sintomas inespecíficos; miocardite, meningoencefalite ou em casos raros, dificuldade respiratória (Rassi *et al.*, 2010; Bern, 2015; Pérez-Molina & Molina, 2018).

### 1.2.2.3 Tratamentos disponíveis e desafios no tratamento da Doença de Chagas

Atualmente apenas dois fármacos são licenciados para o tratamento da DC, benznidazole (BZN) e nifurtimox (NTX), que pertencem à classe dos nitro-heterocíclicos e são utilizados há 50 anos para o tratamento da DC. O BZN é utilizado como primeira linha de tratamento, é um pró-fármaco derivado de nitroimidazol, que exerce atividade tripanocida após sua ativação para produzir metabólitos reativos. Em *T. cruzi*, a BZN é ativada enzimaticamente por nitroredutases tipo I, uma classe de enzimas insensíveis ao oxigênio presentes em vários protozoários, para os quais não há homologia em mamíferos. Os metabólitos reativos gerados são tóxicos, resultando em uma rápida e localizada ação tripanocida contra as formas intra e extracelular do parasito (Müller Kratz *et al.*, 2018; Müller Kratz, 2019).

Os efeitos adversos causados pelo uso de BZN mais comuns são: náuseas, vômitos, hipersensibilidade, incluindo dermatite com erupções cutânea, mialgias, artralgias, linfadenopatia, podendo ocorrer também polineuropatia, parestesias, polineurite e distúrbios na medula óssea. Preocupações potenciais referentes à toxicidade incluem carcinogenicidade, teratogenicidade (já que o fármaco ultrapassa a barreira transplacentária), efeitos na fertilidade masculina e gravidez (Pinazo *et al.*, 2010; Bern, 2015; Crespillo-Andújar *et al.*, 2018; Müller Kratz *et al.*, 2018; Müller Kratz, 2019).

Nifurtimox (NTX) é um nitrofurano, que age inibindo a síntese de ácido pirúvico e interrompe o metabolismo de carboidratos de *T. cruzi*. Efeitos adversos gastrointestinais (anorexia, perda de peso, náusea e vômito) ocorrem em até 70% dos pacientes, efeitos tóxicos neurológicos incluem irritabilidade, insônia, desorientação e tremores (Bern, 2015; Crespillo-Andújar *et al.*, 2018; Müller Kratz *et al.*, 2018; Müller Kratz, 2019).

O tratamento anti-tripanosomal é indicado em todos os casos agudos, acidentes laboratoriais e reativações, nas quais a taxa de cura pode chegar a 80-90% em indivíduos de

menor faixa etária. Em casos congênitos a eliminação do parasita pode chegar a 100%. Em casos crônicos, o tratamento é indicado para indivíduos menores de 18 anos, acima desta faixa etária os pacientes podem receber a terapia, sendo aconselhado individualizar o tratamento, observando as possíveis comorbidades já existentes no paciente, critérios de exclusão como a cardiopatia irreversível ou limite de máximo de idade de 50 a 55 anos, avaliando novamente seu risco-benefício por conta da toxicidade e efeitos adversos dos fármacos (Müller Kratz *et al.*, 2018; Pérez-Molina & Molina, 2018; Müller Kratz, 2019). Não é aconselhado o tratamento em pacientes com insuficiência renal ou hepática, pela alta toxicidade, e em gestantes, devido ao potencial teratogênico dos fármacos, em caso de risco para a mãe a terapia pode ser realizada após o segundo trimestre, sendo necessário, nas duas situações avaliar o risco-benefício (Rassi *et al.*, 2010; Bern, 2015; Müller Kratz *et al.*, 2018; Pérez-Molina & Molina, 2018; Echeverria & Morillo, 2019).

Além dos efeitos adversos causados pela toxicidade dos fármacos, a resistência ao tratamento vem sendo relatada, para BZN. O mecanismo de geração de resistência provavelmente é multifatorial, envolvendo maior atividade das bombas de efluxo e mutação e/ou modulação do gene do parasita em sua expressão. (Molina *et al.*, 2014; Müller Kratz, 2019).

## **2. Inibidores virais: Lopinavir e Pritelivir**

Os antirretrovirais inibidores de protease são utilizados no tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e inibem a enzima aspartil protease do HIV. A protease do HIV-1 é responsável pela clivagem das proteínas precursoras em proteínas estruturais e enzimas que têm um papel essencial na replicação e maturação viral. A inibição da protease produz vírus imaturos e não infecciosos (Flexner, 1998; Chandwani & Shuter, 2008).

Com a utilização da terapia antirretroviral houve uma diminuição drástica de doenças oportunistas, principalmente causadas por protozoários. Estudos demonstram que, além de bloquear a multiplicação do vírus, a inibição de proteases também pode afetar o crescimento de outros microrganismos (Abbenante & Fairlie, 2005), como *Leishmania sp.* (Savoia *et al.*, 2005), *T. cruzi* (De Diego *et al.*, 2001; Sangenito *et al.*, 2016), *T. gondii* (Derouin & Santillana-Hayat, 2000; Pozio *et al.*, 2005) e *Plasmodium spp.* (Parikh *et al.*, 2005).

Lopinavir (LPV) é um antirretroviral, inibidor de protease aspártica e tem despertado o interesse para estudos de vários organismos com a protease presente. Parikh e col., (2005)

demonstraram a eficácia *in vitro* de Lopinavir em *P. falciparum*, onde apresentou IC<sub>50</sub> de 0,9 µM. Abou-El-Naga e col., (2017) realizaram ensaios *in vivo* em modelo murino, com a cepa RH de *T. gondii*, altamente virulenta, onde obteve 80% de sobrevivência dos animais infectados e diminuição de 87% de taquizoítos viáveis no peritônio após 7 dias de tratamento, com doses de 160/40mg/kg/dia de LPV em combinação com Ritonavir, por 5 dias de forma intraperitoneal. Em *L. amazonensis*, Rebello e col., (2018) demonstraram que o antirretroviral induz alterações no metabolismo lipídico de promastigotas. Sangenito e col., (2019) analisaram os efeitos de Lopinavir em *T. cruzi in vitro* e observaram que diminuiu a adesão de tripomastigotas após o pré-tratamento, também promoveu alterações estruturais e bioquímicas no parasito e inibiu a proliferação de amastigotas, apresentando IC<sub>50</sub> de 6,25 µM em ensaios com células LLC-MK2 e 12,5 µM em macrófagos.

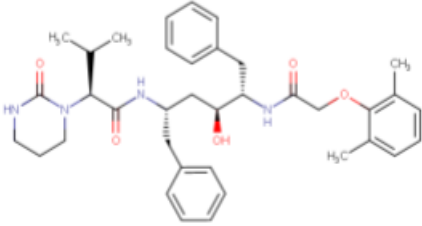
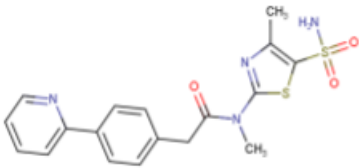
Em *T. gondii* são codificadas 7 aspartil proteases (ASPs), com apenas ASP1, ASP3 e ASP5 sendo expressos significativamente no estágio de taquizoíto. Entre estes, ASP1 é específico para coccídios e dispensável em cultura de tecidos, bem como no modelo de infecção de camundongo (Polonais *et al.*, 2011). A aspartil protease ASP5 associada ao complexo de Golgi foi recentemente associada ao estabelecimento da rede intravacuolar e ao tráfego de efetores para a membrana do vacúolo parasitóforo (Hammoudi *et al.*, 2015). Já ASP3 é uma aspartil protease crítica para a invasão e saída de taquizoítas. A depleção de ASP3 causa um bloqueio grave tanto na invasão quanto na saída que pode ser atribuído a um defeito na descarga da roptria e na lise da membrana plasmática do hospedeiro, respectivamente (Dogga *et al.*, 2017).

Pritelivir (BAY-57-1293) é um inibidor não nucleosídico que atua especificamente na inibição do complexo viral helicase-primase, que desenrola a dupla fita de DNA viral em cadeia e sintetiza oligoribonucleotídeos iniciadores para a síntese de DNA pela DNA polimerase viral, assim, o fármaco age impedindo a bifurcação da replicação viral. Atualmente está em ensaio clínico de fase 2 em pacientes imunocomprometidos com infecção de herpes simplex tipo I e II, resistente ao aciclovir, antiviral mais utilizado para a doença (Kleymann *et al.*, 2002).

Alguns estudos demonstraram que Pritelivir tem ótima ação no SNC, pois foi eficaz no tratamento de herpes simplex encefálica e também na diminuição da produção de proteínas do vírus que estão associadas a doença de Alzheimer, característica importante para uma

possível atuação em cistos cerebrais de *T. gondii*. (Wozniak, *et al.*, 2013; Quenelle *et al.*, 2018).

Tabela 1. Fórmulas estruturais e moleculares dos inibidores virais, Lopinavir e Pritelivir.

Inibidores virais		
Fármaco	Estrutura química	Fórmula molecular
Lopinavir *	 <p>The chemical structure of Lopinavir is a complex molecule. It features a piperidine ring connected to a chiral center with a methyl group and a propyl group. This is further linked to a chain containing a benzyl group, a hydroxyl group, and a 2,4-dimethylphenoxy group.</p>	C 37 H 48 N 4 O 5
Pritelivir **	 <p>The chemical structure of Pritelivir consists of a pyridine ring connected to a benzene ring, which is further linked to a chain containing a carbonyl group, a methyl group, and a 2-methyl-5-sulfamoylthiazole ring.</p>	C 18 H 18 N 4 O 3 S 2

Fonte: \* <https://go.drugbank.com/drugs/DB01601>

\*\* <https://go.drugbank.com/drugs/DB11844>

### 3. Justificativa

As doenças negligenciadas afetam milhões de pessoas por ano e possuem elevada morbidade e mortalidade, gerando um grande impacto na vida pessoal e econômica destes indivíduos e conseqüentemente na de seus países. Estas doenças normalmente se estabelecem em países pobres e em desenvolvimento, onde as indústrias farmacêuticas não vêem interesse no desenvolvimento de novas terapias para essas doenças, pela falta do retorno financeiro. Devido a baixa eficácia, elevados efeitos adversos causados, falta de segurança para uso em faixas etárias mais elevadas, interações negativas com o uso concomitante com outras comorbidades ou durante a gravidez ou ainda pelos relatos de resistência, é de extrema importância a pesquisa de novos compostos ativos e novas terapias. Considerando a realidade atual e a estagnação de pesquisas pela indústria farmacêutica perante as doenças negligenciadas, o reposicionamento de fármacos é uma excelente estratégia que alia pouco orçamento com a urgência de novas terapias. Esta estratégia possui custos e tempo reduzidos no desenvolvimento devido ao conhecimento da segurança em seu uso, que esta alternativa sugere. O reposicionamento de fármacos não é uma novidade, vários medicamentos utilizados atualmente para diversas doenças foram realocados em sua indicação ou tiveram novos alvos encontrados.

Sendo assim, o reposicionamento continua sendo a melhor alternativa para a descoberta de novos tratamentos para as doenças negligenciadas, pois diminui os custos e o tempo da pesquisa em anos. Dados na literatura, vem demonstrando a ação de antivirais contra outros microrganismos, principalmente protozoários, este trabalho tem como objetivo a avaliação da atividade antiparasitária de dos inibidores virais, Lopinavir e Pritelivir contra aos protozoários: *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antiparasitária de dois inibidores virais frente aos protozoários *T. gondii* e *T. cruzi*.

### 4.2 Objetivos específicos

#### 4.2.1 Parte I – Lopinavir

- Verificar a citotoxicidade de Lopinavir em células de fibroblastos humanos (NHDF);
- Avaliar o efeito de Lopinavir na proliferação e invasão das cepas TgCTBr8 e TgCTBr5 de *T. gondii*, em células NHDF *in vitro*;
- Avaliar o efeito de Sulfadiazina e Pirimetamina em combinação ou não com Lopinavir na proliferação nas cepas TgCTBr8 e TgCTBr5 de *T. gondii*, em células NHDF *in vitro*;
- Avaliar o potencial cistogênico das cepas TgCTBr8 e TgCTBr5 de *T. gondii* mediante o tratamento *in vitro*.
- Estudar o efeito de Lopinavir isoladamente ou em associação com Sulfadiazina e Pirimetamina na fase aguda da toxoplasmose em modelo murino;
- Estudar o efeito de Lopinavir na fase crônica da toxoplasmose em modelo murino.

#### 4.2.2 Parte II - Pritelivir

- Verificar a citotoxicidade de Lopinavir em células de fibroblastos humanos (NHDF);
- Avaliar o efeito de Pritelivir na proliferação de *T. gondii*, cepa RH, em células NHDF *in vitro*;
- Avaliar o efeito de Pritelivir na proliferação de *T. cruzi*, cepa Y, em células NHDF *in vitro*.

## 5. Materiais e Métodos

### 5.1 Cultivo e manutenção de células Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF)

Cultura de células NHDF (Lonza) foram cultivadas em garrafas de cultura (Sarstedt) de 25 cm<sup>2</sup> e mantidas com meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich/EUA) completo suplementado com antibióticos (penicilina, estreptomicina e anfotericina, este último com exceção para o cultivo de *T. cruzi*), L-glutamina 2 mM e 2% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO). As células foram mantidas em estufa umidificada a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após a formação de monocamadas confluentes, o meio foi retirado das culturas e estas foram tratadas com 1 mL de tripsina-verseno (Sigma-Aldrich/EUA) a 0,25% e incubadas por 1 minuto para desprendimento das células a 37°C. A tripsina foi inativada pelo acréscimo de meio RPMI suplementado com soro para posterior distribuição e passagem de células entre a garrafa original e novas garrafas de cultura.

### 5.2 Manutenção *in vitro* de parasitos

Taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH, originalmente isolada de uma criança de 6 anos nos EUA (Sabin, 1941), TgCTBr8 (do tipo BrII e classificada como virulenta) e TgCTBr5 (do tipo BrIII e classificada como avirulenta) originalmente isoladas recém-nascidos com Toxoplasmose Congênita no estado de Minas Gerais (Carneiro *et al.*, 2013), foram mantidos em culturas de NHDF cultivadas em meio RPMI completo e incubados em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Quando necessário foi realizada a coleta e transferência dos parasitos do sobrenadante das culturas de NHDF previamente infectadas, onde as células estavam lisadas, realizando a passagem para frascos contendo células em monocamada não infectadas.

Tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y, originalmente isolada de uma paciente de descendência japonesa em 1953, no estado de São Paulo, Brasil (Amato Neto, 2010), foram mantidas em culturas de NHDF cultivadas em meio RPMI completo e incubados em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Quando necessário foi realizada a coleta e transferência dos parasitos do sobrenadante das culturas de HFF previamente infectadas, onde as células estejam lisadas, realizando a passagem para garrafas novas.

### 5.3 Fármacos

Lopinavir (LPV) e o Ritonavir (RTV) foram doados por Farmanguinhos, Brasil. RTV foi utilizado em associação com LPV nos ensaios *in vivo* pois inibe enzimas que metabolizam LPV, permitindo ao LPV atingir concentrações plasmáticas superiores à outros medicamentos utilizados em conjunto, aumentando a eficiência clínica do tratamento. Pritelivir (PTV) foi adquirido na empresa MedChemExpress, Estados Unidos. Nos experimentos *in vitro*, os fármacos foram diluídos em DMSO em concentrações estoques suficientes para que a concentração final de DMSO nos ensaios nunca ultrapassasse 0,1%. Nos ensaios *in vivo*, LPV e RTV foram diluídos em carboximetilcelulose a 0,20%.

### 5.4 Análise do efeito citotóxico em culturas de células dos compostos utilizados

Com o objetivo de avaliar o efeito citotóxico dos diferentes compostos na célula hospedeira, foi utilizado o método colorimétrico do MTS/PMS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), no qual sais de tetrazólio são convertidos ao formazan pela enzima succinato-desidrogenase mitocondrial em células viáveis e metabolicamente ativas (Berridge *et al*, 2005).

As células foram então tratadas com diferentes concentrações dos fármacos por 7 dias, período no qual a viabilidade das células foi avaliada. Para isto, fibroblastos foram semeados em placas de 96 poços em uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço. Após a confluência, as células foram incubadas (3 poços por concentração) com meio RPMI completo na ausência ou presença dos compostos por 7 dias a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Ao fim do tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS estéril pH 7,2 e os poços preenchidos com 100µL de PBS + 10 mM de glicose e adicionados 20µL do reagente MTS/PMS (20:1), solução estoque 2 mg/ml MTS e 0,92 mg/ml PMS diluídos em PBS (Promega, Madison WI, USA). A absorbância foi avaliada em 490 nm, em leitor de microplaca Biotek, após 3h de incubação, e a citotoxicidade calculada como a porcentagem de células viáveis em relação às células controle (não tratadas).

A concentração necessária para inibir em 50% a proliferação das células (CC<sub>50</sub>) foi obtida através da análise das curvas padrões das diferentes concentrações testadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.

A partir dos resultados obtidos foi possível calcular o Índice de Seletividade:  $IS=CC50/IC50$ . Quanto maior for o valor de IS obtido, menos tóxico ao hospedeiro e mais seletivo ao parasito é o composto (Krivogorsky *et al*, 2008).

### **5.5 Avaliação do efeito antiproliferativo *in vitro* em *T. gondii***

Para avaliação do efeito antiproliferativo, células NHDF foram cultivadas em lamínulas de vidro em placas de cultura de 24 poços a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Monocamadas de NHDF foram lavadas com meio RPMI para retirada de debris e restos celulares e então infectadas com taquizoítos recém egressos de culturas de NHDF em uma proporção de 5:1 (parasitos por células). Os taquizoítos das cepas RH, TgCTBr5 e TgCTBr8 recém egressos foram coletados e transferidos para tubo Falcon de 15 mL e centrifugados a 1.750 rpm por 5 minutos. O sedimento de parasitos resultante foi ressuspensionado em 1 mL de meio, e então, uma alíquota de 10 µL foi ressuspensionada em 490 µL de líquido de contagem (Formaldeído+PBS) em tubo de 1,5 ml para fixação dos parasitos. Foi utilizada uma alíquota de 10 µL desta solução na câmara de Neubauer para a quantificação dos parasitos para a infecção das placas e a contagem foi realizada através de microscópio óptico Leica.

Para os taquizoítos das cepas TgCTBr8 e TgCTBr5, após 6 h de interação, as células foram lavadas para remover parasitos extracelulares e ao término de 24 h de interação foi realizado o tratamento com diferentes concentrações dos fármacos. Já para a cepa RH, os taquizoítos interagiram por apenas 4h, e após este período as células foram lavadas e o tratamento foi realizado. Como controle, células infectadas foram incubadas somente com meio de cultura. Após 24 h e/ou 48h de tratamento as células infectadas foram lavadas com PBS, fixadas com Bouin por 20 min., lavadas novamente com álcool 70% e coradas com as soluções 2 e 3 do kit Panótico Rápido® (Laborclin) por 45 e 10 segundos respectivamente. As lamínulas coradas foram montadas em lâminas permanentes de microscopia com Entelan® e a infecção foi avaliada por meio de análise ao Microscópio Óptico de Campo Claro Olympus BX 40.

Para determinar a proliferação de parasitos, foram contadas um total de 600 células em duas lamínulas diferentes para cada concentração, foi avaliada então o índice de proliferação de acordo com Araújo-Jorge & Souza (1984): (parasitos totais X % de células infectadas / células totais). E posteriormente realizado o cálculo da (Concentração inibitória de 50%) (IC<sub>50</sub>). O ensaio foi realizado em triplicatas independentes.

### 5.6 Ensaio de invasão para *T. gondii*

Taquizoítos das cepas TgCTBr5 e TgCTBr8 recém egressados foram coletados do frasco de cultivo. Após contagem em câmara de Neubauer, os taquizoítos foram ressuspensos em meio RPMI completo. Os parasitos em meio RPMI foram aliqüotados em diferentes microtubos de 1,5 mL (cada tubo recebeu 1 mL na densidade de  $1 \times 10^6$  parasitos). Os parasitos contidos nos tubos foram tratados por 2h com diferentes concentrações de LPV. Após o término do tratamento os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos e o pellet ressuspensado apenas em meio RPMI, posteriormente, os parasitos foram incubados com monocamadas de células NHDF em placas de 24 poços para interação, por 2 horas. Ao término da interação a cultura foi lavada para remoção dos parasitos extracelulares e fixadas com Bouin por 20 min., lavadas novamente com álcool 70% e coradas com as soluções 2 e 3 do kit Panótico Rápido® (Laboreclin) por 45 e 10 segundos respectivamente. As lamínulas coradas foram montadas em lâminas permanentes com Entelan®. A infecção foi avaliada por meio de análise ao Microscópio Óptico de Campo Claro Olympus BX 40. A atividade anti-*Toxoplasma* foi determinada pela porcentagem de células infectadas para as diferentes concentrações testadas, verificando se houve inibição da invasão dos taquizoítos em cultura de células humanas no ensaio de 4h. Foi aplicado aos resultados o teste estatístico One Way ANOVA. O ensaio foi realizado em triplicatas independentes.

### 5.7 Interação medicamentosa *in vitro*

Os valores do índice da concentração inibitória fracionada (FICI) foram calculados de acordo com o modelo aditivo Loewe, definido pela equação  $a / A + b / B = 1$ , onde A e B são o IC<sub>50</sub> dos fármacos individuais e “a” e “b” são o IC<sub>50</sub> dos fármacos em combinação (Tallarida, 2006). O efeito da combinação foi analisado de acordo com FICI: < 0,5, sinergismo; > 0,5–4, sem interação; e > 4, antagonismo (Odds, 2003).

### 5.8 Avaliação do potencial cistogênico das cepas TgCTBr8 e TgCTBr5 de *T. gondii*

Células NHDF foram infectadas com taquizoítos das cepas TgCTBr5 e TgCTBr8, na proporção de (5:1), após 6 h de interação, as células foram lavadas para remover parasitos extracelulares e ao término de 24 h de interação foi realizada a retirada do controle da infecção. Estas lamínulas foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído a 4% por 20

min em temperatura ambiente e reservadas com 1 mL de PBS até o término dos tratamentos. O tratamento com diferentes concentrações de LPV foi realizado e após o período de 24 e 48 horas as células foram lavadas com PBS e fixadas por 20 minutos com paraformaldeído a 4% em temperatura ambiente.

Todas as lamínulas foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5% por mais 20 minutos e incubadas em solução de bloqueio contendo 3 % de albumina (BSA) em PBS por 1 h em refrigeração, seguido de incubação com o anticorpo primário anti-SAG-1 (1: 300) (superfície de taquizoíta) por 1 h, em seguida, as células foram lavadas com BSA 3% e incubadas com anticorpos secundário IgG de cabra anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific) a uma diluição de 1: 600, por 1h.

Para identificação de cistos, as culturas foram incubadas com a lectina aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA) conjugada a TRITC (Vector Laboratories) (1:100) por 30 min., juntamente a este procedimento as lamínulas foram marcadas com 5 µg/mL de 4,6-diamino-2-fenilindole (DAPI; Sigma-Aldrich).

Por último, as lamínulas foram montadas em lâminas com Prolong Gold® (Life Technologies) e as amostras examinadas em microscópio de imunofluorescência EVOS. O ensaio foi realizado em duplicatas independentes.

### **5.9 Avaliação do efeito antiproliferativo *in vitro* em *T. cruzi***

Para avaliação do efeito antiproliferativo, tripomastigotas sobrenadantes de culturas de NHDF foram coletadas e transferidas para tubo Falcon de 15 mL e centrifugadas a 1.750 rpm por 5 minutos. O sedimento de parasitos resultante foi ressuscitado em 1 mL de meio, e então, uma alíquota de 10 µL foi ressuscitada em 490 µL de líquido de contagem (Formaldeído+PBS) em tubo de 1,5 ml para fixação dos parasitos. Foi utilizada uma alíquota de 10 µL desta solução na câmara de Neubauer para a quantificação dos parasitos para a infecção das placas e a contagem foi realizada através de microscópio óptico Leica. Foi realizada a infecção de placas de 24 poços com monocamadas em uma proporção de 10:1 (parasitos por células).

Após 24 h de interação, as células foram lavadas para remoção de parasitos extracelulares, o tratamento com diferentes concentrações do fármaco Pritelivir foi então realizado. Como controle, células infectadas foram incubadas somente com meio de cultura.

Após 24 e 48 horas de tratamento todas as lamínulas foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído a 4% por 20 min, lavadas novamente 3x com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5% por mais 10 minutos e incubadas em solução de bloqueio contendo 3 % de albumina (BSA) em PBS por 1 h em temperatura ambiente. Após as lamínulas foram coradas com 5 µg/mL de DAPI (Sigma-Aldrich).

Por último, as lamínulas foram montadas em lâminas com Prolong Gold® (Life Technologies) e as amostras examinadas em microscópio de imunofluorescência EVOS. As células e parasitos foram contados através do software Fiji Image J, com plugin ITCN. O ensaio foi realizado em triplicatas independentes.

## **5.10 Ensaio *in vivo* em *T. gondii***

### **5.10.1 Camundongos e obtenção do parasito**

Com autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFMG pelo número de protocolo 32/2019, foram utilizados camundongos suíços fêmeas com idade entre 6 a 8 semanas (20-26g). Os animais foram acondicionados em caixas contendo 5 camundongos cada e a alimentação e água foram oferecidos *ad libitum*. Para a preparação dos fármacos, as suspensões de lopinavir, ritonavir, sulfadiazina e pirimetamina foram preparadas em carboximetilcelulose a 0,20% diluídas em PBS, para atingir a dosagem necessária (Alves & Vitor, 2005).

Para o modelo agudo de infecção foram recuperados taquizoítos de *T. gondii* da cepa TgCTBr8 (originalmente isolada de um recém-nascido com Toxoplasmose Congênita no estado de Minas Gerais) do peritônio de camundongos previamente infectados com passagens de cistos da cepa de interesse. O lavado peritoneal foi filtrado e contado em câmara de Neubauer.

Para o modelo crônico de infecção cistos cerebrais da cepa TgCTBr5 foram recuperados de camundongos previamente infectados através de macerados cerebrais, homogeneizados em 1 mL de PBS, para contagem de cistos do parasita, foram analisadas 3 amostras de 10µL do macerado de cérebro em microscópio óptico e calculada a média dos cistos encontrados em relação à diluição realizada.

### 5.10.2 Modelo agudo de infecção

Foram inoculados de forma intraperitoneal  $10^4$  taquizoítos de *T. gondii* da cepa TgCTBr8 em cada camundongo e após 24 horas de infecção foi iniciado o tratamento com administração por via oral, através de gavagem, com duração de 10 dias. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos e receberam o tratamento da seguinte forma:

- Grupo 1: não tratado (administração somente do veículo carboximetilcelulose 0,2%);
- Grupo 2: tratado com lopinavir/ritonavir 12/3 mg/kg/dia;
- Grupo 3: tratado com lopinavir/ritonavir 20/5mg/kg/dia;
- Grupo 4: tratado com sulfadiazina/pirimetamina 40/1 mg/kg/dia.
- Grupo 5: tratado com lopinavir/ritonavir 12/3 mg/kg/dia + sulfadiazina/pirimetamina 40/1mg/kg/dia;

Foi acompanhada a mortalidade diária e sinais clínicos por um período de 30 dias. Os animais muito doentes foram eutanasiados com sobredose de anestésico Ketamina+Xilazina (CEVA) e deslocamento cervical. Foram investigados em todos os animais que sucumbiram antes do período final de observação, a presença de taquizoítos no pulmão, através do *imprint* do órgão em lâminas, para comprovação de toxoplasmose aguda.

### 5.10.3 Modelo crônico de infecção

Camundongos foram infectados com 5 cistos da cepa TgCTBr5 por via oral e após 21 dias de infecção foi iniciado o tratamento por gavagem, diariamente por 21 dias. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos e receberam o tratamento da seguinte forma:

- Grupo 1: não tratado (administração do veículo carboximetilcelulose 0,2%);
- Grupo 2: tratado com lopinavir/ritonavir 12/3 mg/kg/dia;
- Grupo 3: tratado com lopinavir/ritonavir 20/5mg/kg/dia;
- Grupo 4: tratado com lopinavir/ritonavir 40/10 mg/kg/dia.

#### 5.10.4 Avaliação dos ensaios *in vivo*

Ao final dos ensaios os animais sobreviventes foram eutanasiados da seguinte forma, primeiramente serão anestesiados com sobredose de Ketamina+Xilazina (CEVA) e em seguida foi realizado o deslocamento cervical, posteriormente seus cérebros foram removidos e homogeneizados em 1mL de PBS, para contagem de cistos do parasito, foram analisadas 3 amostras de 10 $\mu$ L/cérebro em microscópio óptico e calculada a média dos cistos encontrados em relação à diluição realizada (média dos cistos X 1000 $\mu$ L/10 $\mu$ L) (Cornelissen *et al.*, 1981), onde foi avaliada a atividade dos compostos isolados e em associação em relação à diminuição do número de cistos.

Foi também avaliada a produção de anticorpos específicos através de ELISA dos animais sobreviventes que não apresentaram cistos cerebrais (Alves & Vitor, 2005), para confirmação da infecção.

#### 5.11 Análise estatística

Os valores de IC<sub>50</sub> calculados nos ensaios *in vitro* foram obtidos através da análise das curvas padrões por regressão não linear obtidas através das diferentes concentrações testadas utilizando o programa GraphPad Prism 5. Para análise de sobrevivência dos ensaios *in vivo*, foi utilizado o método de Kaplan-Meier através do programa GraphPad Prism 5. Os dados com  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## **6. Resultados**

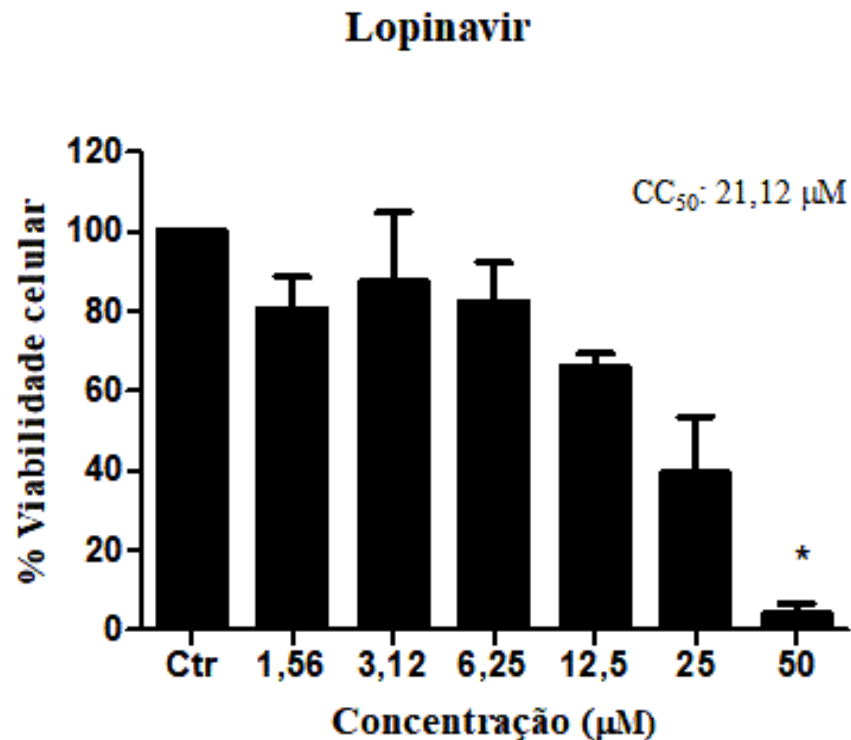
### **6.1. Parte I - Lopinavir**

#### **6.1.1 Avaliação da citotoxicidade de Lopinavir em células NHDF**

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados através do método colorimétrico MTS/PMS, onde a viabilidade celular pode ser avaliada através da conversão dos sais de tetrazólio em formazan pela enzima succinato-desidrogenase mitocondrial em células viáveis e metabolicamente ativas.

Para a realização dos ensaios, placas de cultura de 96 poços foram semeadas com  $2 \times 10^5$  células e tratadas com diferentes concentrações 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50  $\mu\text{M}$  com LPV, por 7 dias. A absorbância foi avaliada em 490 nm, em leitor de microplaca Biotek, após 3h de incubação com os reagentes MTS/PMS, e a citotoxicidade calculada como a porcentagem de células viáveis em relação às células controle (não tratadas).

Os resultados nas análises em células NHDF demonstraram que LPV apresenta efeito citotóxico em 50% das células ( $CC_{50}$ ) na concentração de  $21,1 \mu\text{M} \pm 1,02$  sendo que a concentração máxima utilizada, 50  $\mu\text{M}$ , diminuiu em 96% a viabilidade celular. A análise estatística demonstrou que houve uma diferença significativa entre o grupo controle e o tratado com 50  $\mu\text{M}$  (Figura 9).



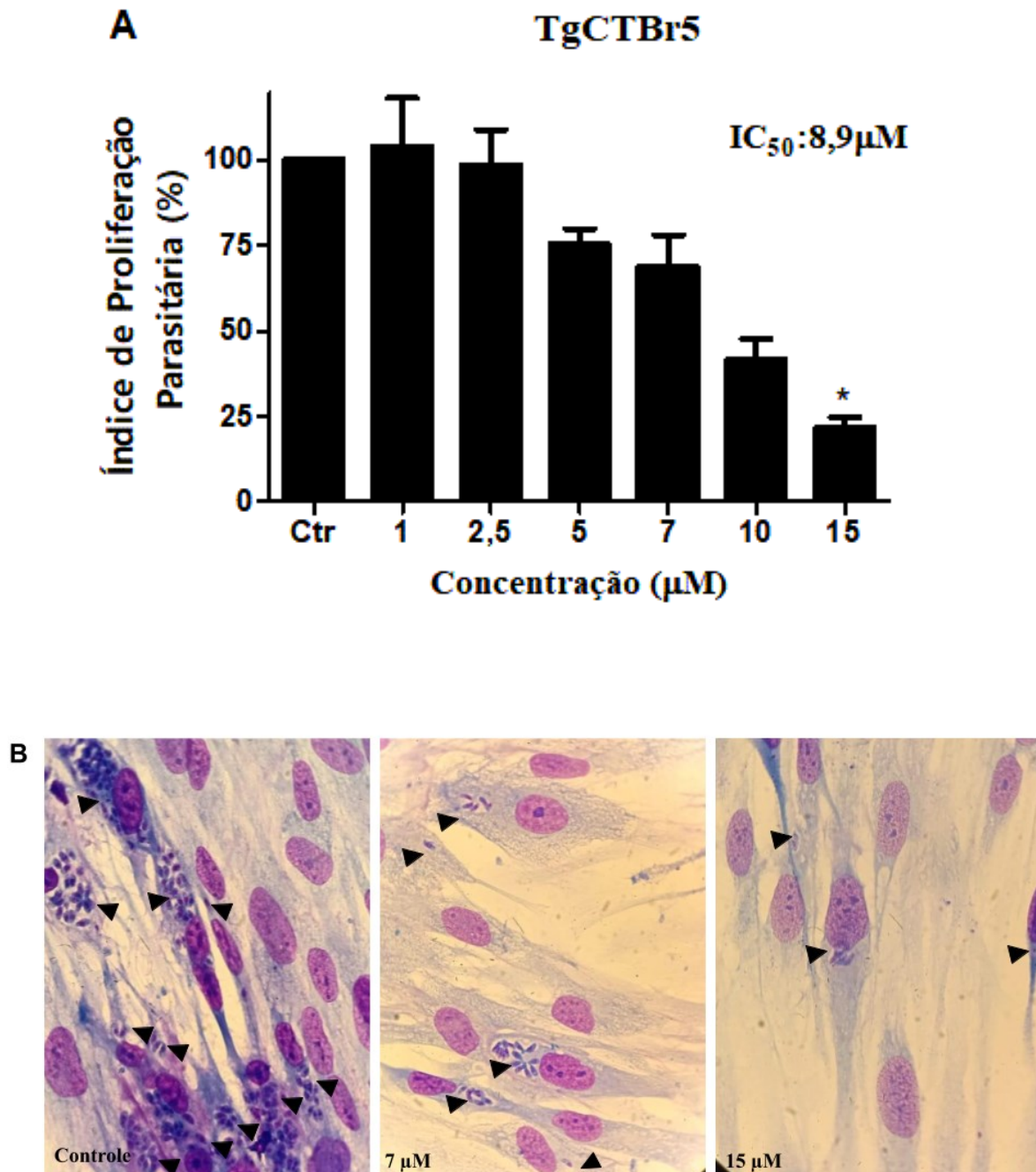
**Figura 9:** Efeito citotóxico de Lopinavir em cultura de células NHDF após 7 dias de tratamento. O efeito citotóxico foi avaliado através do ensaio de MTS/PMS, onde Lopinavir apresentou CC<sub>50</sub> na concentração de 21,12 µM ± 1,02. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes e analisados pelo teste one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) (\* $P=0,0081$ ).

### 6.1.2 Avaliação do efeito antiproliferativo *in vitro* de Lopinavir nas cepas TgCTBr5 e TgCTBr8 de *T. gondii*

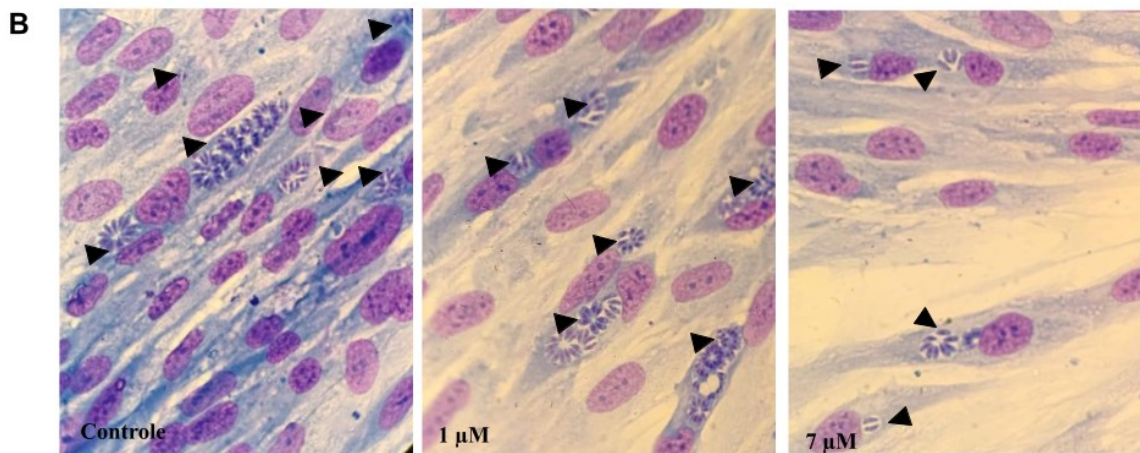
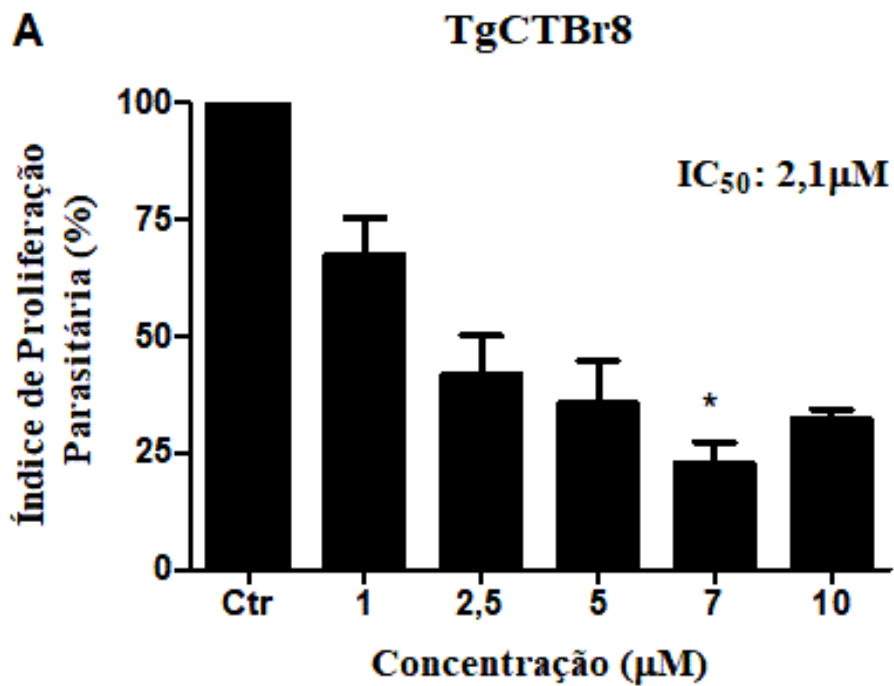
O efeito antiproliferativo de LPV em taquizoítos de *T. gondii* das cepas TgCTBr5 e TgCTBr8 foram avaliados em culturas de células NHDF previamente infectadas por 24 h. Após este período, os parasitos extracelulares foram removidos por lavagem e as células foram tratadas por 24 h inicialmente com diferentes concentrações de LPV para ambas as cepas, 1, 2,5, 5, 7 e 10 µM. Após análise dos resultados da cepa TgCTBr5, foi acrescentada ao ensaio a concentração de 15 µM. Ao término do tratamento, as células foram fixadas e coradas para visualização em microscopia óptica de campo claro.

Foi observado uma grande diferença entre as cepas em relação ao IC<sub>50</sub> obtido, sendo 8,9 µM ± 1,05 para a TgCTBr5 e 2,1 µM ± 1,17 para a TgCTBr8 (Figuras 10A e 11A). Mas foi observado em ambas uma drástica redução da proliferação, sendo que LPV a 15 µM para

TgCTBr5 e a 7  $\mu\text{M}$  para TgCTBr8, inibiu cerca de 78% da proliferação dos parasitos. Em ambos os casos houve diferença estatística significativa. Nas figuras 10B e 11B, pode-se observar a diminuição da quantidade de parasitos intracelulares e número de células infectadas.



**Figura 10:** (A) Efeito antiproliferativo de Lopinavir em taquizoítos da cepa TgCTBr5 de *T. gondii* em células NHDF, após 24 horas de tratamento. Os resultados são a média de 3 experimentos independentes.  $*P = 0,0055$ , os resultados foram analisados pelo teste one-way ANOVA (Kruskal-Wallis). (B) Células infectadas e não tratadas, células tratadas com 7  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$ , pontas das setas indicam células infectadas. As imagens foram obtidas através de lâminas coradas e fotografadas utilizando microscópio óptico de campo claro.



**Figura 11:** (A) Efeito antiproliferativo de Lopinavir em taquizoítos da cepa TgCTBr8 de *T. gondii* em células NHDF, após 24 horas de tratamento. As imagens foram obtidas através de lâminas coradas e fotografadas utilizando microscópio óptico de campo claro. Os resultados são a média de 3 experimentos independentes. \*  $P < 0,0098$ , os resultados foram analisados pelo teste one-way ANOVA (Kruskal-Wallis). (B) Células infectadas e não tratadas, células tratadas com 1 µM e 7 µM, pontas das setas indicam células infectadas.

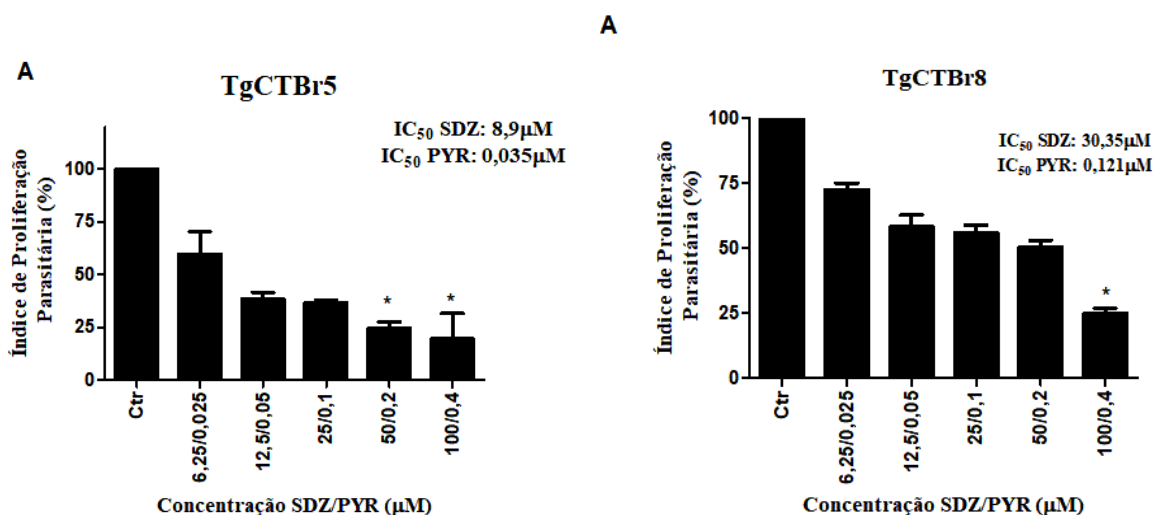
Após a análise da concentração citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>) em células NHDF e da concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) de LPV contra as duas cepas, TgCTBr5 e TgCTBr8, foi possível calcular o Índice de Seletividade (SI) deste fármaco em relação ao parasito.

Calculando o SI como a razão entre  $CC_{50}/IC_{50}$ , foi observado que Lopinavir foi 10 vezes mais seletivo para a cepa TgCTBr8 e 2,4 vezes mais seletivo para a cepa TgCTB5 do que para células NHDF.

### 6.1.3 Avaliação do efeito antiproliferativo *in vitro* da associação Sulfadiazina e Pirimetamina nas cepas TgCTBr5 e TgCTBr8 de *T. gondii*

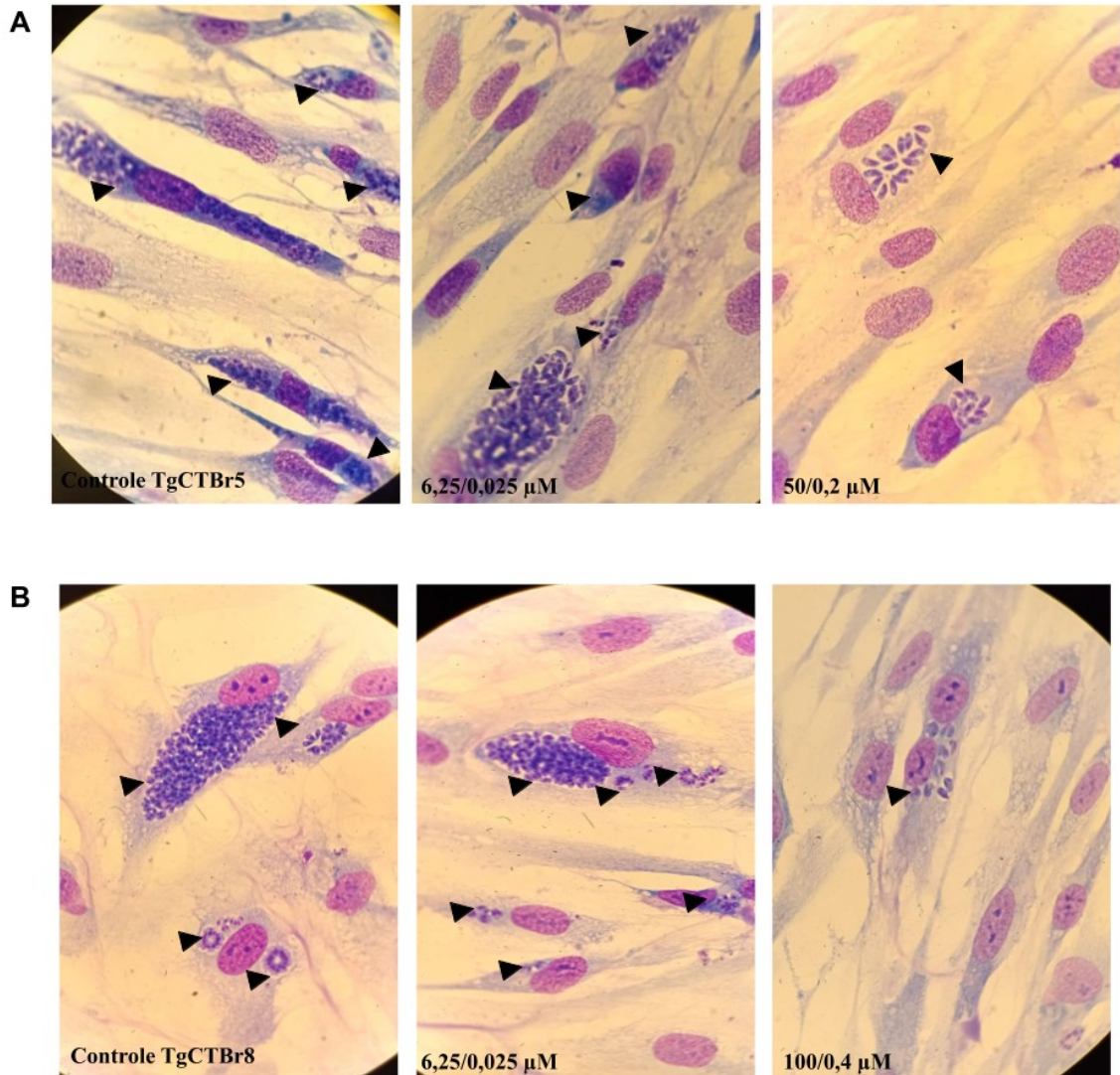
Foram realizados ensaios antiproliferativos de mesma metodologia anteriormente citada, para avaliação da inibição cepas TgCTBr5 e TgCTBr8 *in vitro* na utilização de SDZ+PYR nas respectivas concentrações: 6,25/0,025; 12,5/0,05; 25/0,01; 50/0,2 e 100/0,4  $\mu$ M. Ao término do tratamento, as células foram fixadas e coradas para visualização em microscopia óptica de campo claro.

Foi observado um efeito dose dependente no tratamento da cepa TgCTBr5, onde o  $IC_{50}$  foi avaliado em 8,9 e  $0,035 \pm 1,20 \mu$ M, para SDZ e PYR, respectivamente. E em concentrações superiores à 50  $\mu$ M foi observada a inibição da proliferação dos parasitos em cerca de 75%. No tratamento da cepa TgCTBr8, foi observada uma elevação do  $IC_{50}$  em relação a cepa TgCTBr5, obtendo valores de 30,35 e  $0,121 \pm 1,13$ , para SDZ e PYR respectivamente, e na concentração de 100/0,4 foi observada a inibição de 75% da proliferação (Figura 12).



**Figura 12:** (A) Efeito antiproliferativo da associação de Sulfadiazina e Pirimetamina em taquizoítos da cepa TgCTBr5 de *T. gondii*, após 24 horas de tratamento, em células NHDF ( $*P=0,0072$ ). (B) Efeito antiproliferativo da associação de Sulfadiazina e Pirimetamina em taquizoítos da cepa TgCTBr8 de *T. gondii*, após 24 horas de tratamento, em células NHDF ( $*P=0,0065$ ). Os resultados são a média de 3 experimentos independentes, os resultados foram analisados pelo teste one-way ANOVA (Kruskal-Wallis).

Nas figuras 13A e 13B pode-se observar a diminuição da quantidade de parasitos intracelulares e número de células infectadas das concentrações próximas e superiores ao IC<sub>50</sub> em relação ao controle. A análise estatística demonstrou diferença estatística significativa em ambos os ensaios.



**Figura 13:** As imagens foram obtidas através de lâminas coradas e fotografadas utilizando microscópio óptico de campo claro. (A) Células infectadas e não tratadas, células tratadas com 6,25/0,025  $\mu\text{M}$  e 50/0,2  $\mu\text{M}$ , cepa TgCTBr5. (B) Células infectadas e não tratadas, células tratadas com 6,25/0,025  $\mu\text{M}$  e 100/0,4  $\mu\text{M}$ , cepa TgCTBr8. Pontas das setas indicam células infectadas.

#### 6.1.4 Avaliação do efeito antiproliferativo *in vitro* de Lopinavir em associação com Sulfadiazina e Pirimetamina nas cepas TgCTBr8 e TgCTBr5 de *T. gondii*

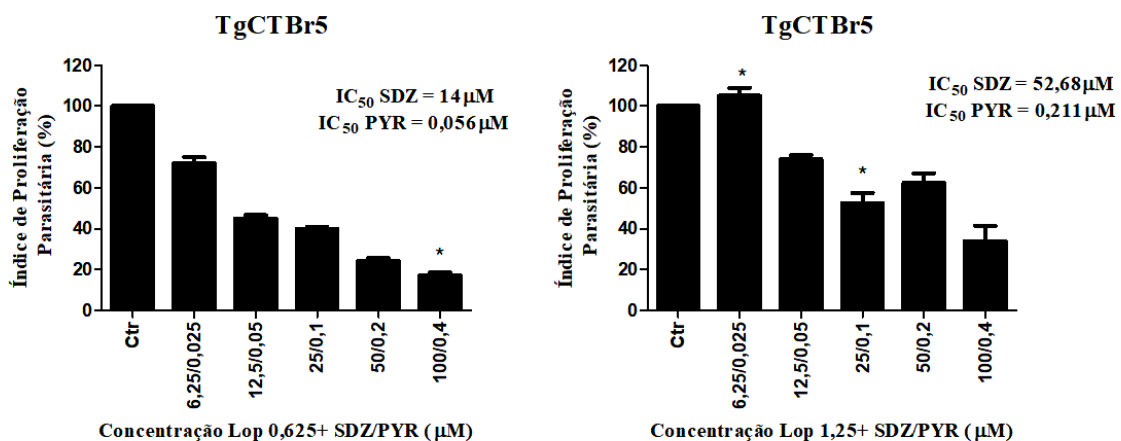
Foram realizados ensaios antiproliferativos de mesma metodologia anteriormente citada, para avaliação da inibição cepas TgCTBr5 e TgCTBr8 *in vitro* na utilização de

SDZ+PYR nas respectivas concentrações: 6,25/0,025; 12,5/0,05; 25/0,01; 50/0,2 e 100/0,4  $\mu\text{M}$ , associado a LPV com concentrações fixas de 0,625 e 1,25. Ao término do tratamento, as células foram fixadas e coradas para visualização em microscopia óptica de campo claro.

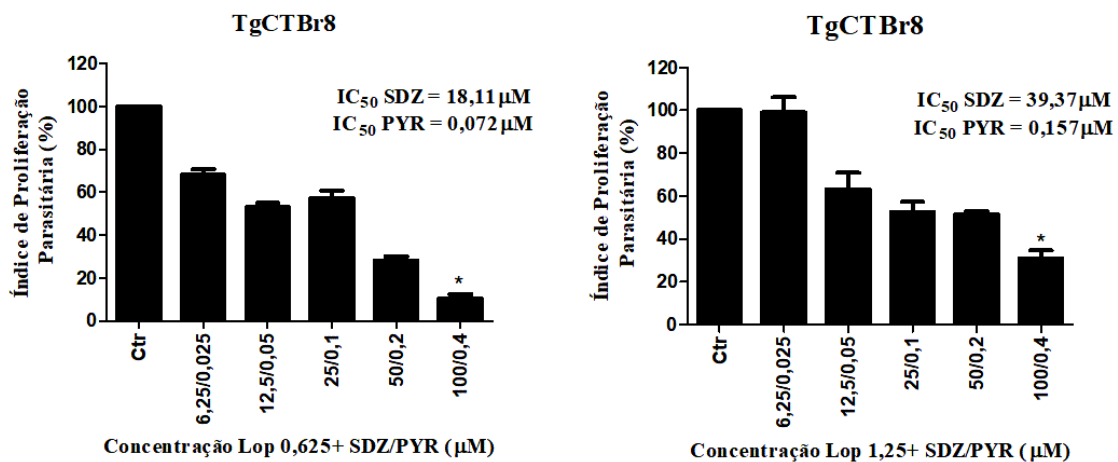
Os valores de  $\text{IC}_{50}$  obtidos para a cepa TgCTBr5 na concentração fixa de LPV 0,625 foram de 14 e 0,056  $\mu\text{M} \pm 1,08$  (FICI=1,64) demonstrando que não houve interação entre os fármacos e na concentração de 1,25  $\mu\text{M}$  fixa foi de 52,68 e 0,211  $\mu\text{M} \pm 1,21$  (FICI=6,06), de SDZ e PYR respectivamente, demonstrando uma interação antagônica entre os fármacos (Figura 14).

Para TgCTBr8 os valores para a concentração fixa de LPV 0,625  $\mu\text{M}$  foram de 18,11 e 0,072  $\pm 1,13$  (FICI=0,89) e na concentração fixa de 1,25  $\mu\text{M}$  foi de 39,37 e 0,157  $\pm 1,16$  (FICI=1,88), de SDZ e PYR respectivamente (Figura 15). Os FICI calculados para as associações com esta cepa mostraram que não houve interação entre SDZ/PYR e LPV, pois todos os valores obtidos estavam na faixa de:  $> 0.5 - 4$  (Odds, 2003).

A análise estatística demonstrou que houve diferença estatística em ambos os ensaios.



**Figura 14:** Efeito antiproliferativo da associação de Sulfadiazina e Pirimetamina com Lopinavir em diferentes concentrações fixas em taquizoítos da cepa TgCTBr5 de *T. gondii*, após 24 horas de tratamento, em células NHDF (LPV 0,625  $\mu\text{M}$  \*  $P=0,0054$ ) (LPV 1,25  $\mu\text{M}$  \*  $P=0,0052$ ). Os resultados são a média de 3 experimentos independentes. Os resultados foram analisados pelo teste one-way ANOVA (Kruskal-Wallis).



**Figura 15:** Efeito antiproliferativo da associação de Sulfadiazina e Pirimetamina com Lopinavir em diferentes concentrações fixas em taquizoítos da cepa TgCTBr8 de *T. gondii*, após 24 horas de tratamento, em células NHDF (0,625 µM \* $P=0,0058$ ) (LPV 1,25 µM \* $P=0,0080$ ). Os resultados são a média de 3 experimentos independentes. Os resultados foram analisados pelo teste one-way ANOVA (Kruskal-Wallis).

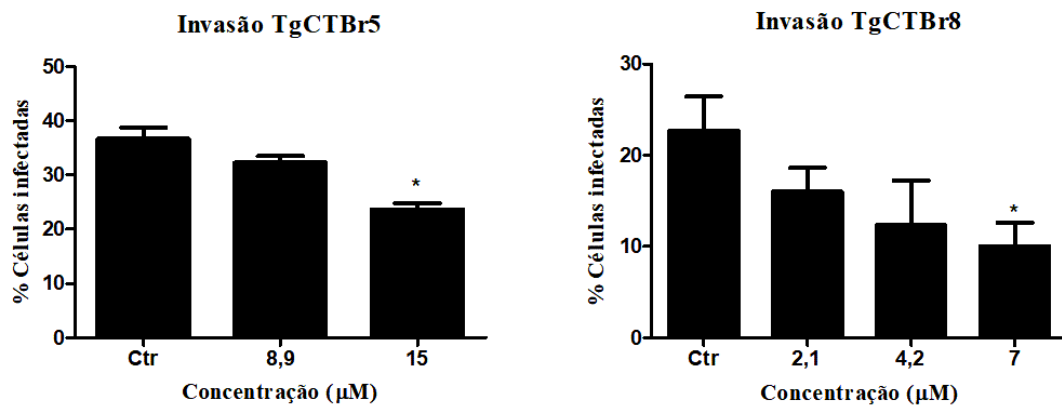
### 6.1.5 Avaliação da invasão de taquizoítos de *T. gondii* das cepas TgCTBr5 e TgCTBr8 em células NHDF após pré-tratamento com Lopinavir

Foi avaliado neste trabalho o efeito de LPV na invasão de taquizoítos de *T. gondii*, como um protozoário intracelular obrigatório, o processo de invasão da célula hospedeira é crucial para a viabilidade do parasito e o estabelecimento da infecção.

Para estes ensaios  $10^6$  taquizoítos, foram pré-tratados com LPV para cada uma das concentrações de 8,9 e 15 µM, para cepa TgCTBr5, e 2,1, 4,2 e 7 µM, para cepa TgCTBr8 (as concentrações iniciais escolhidas se referem ao  $IC_{50}$  obtidos para cada cepa) e mantidos em estufa por 2 h. Ao término do tratamento, foram realizadas 3 sucessivas centrifugações para lavagem e retirada do fármaco. Por seguinte os taquizoítos foram ressuspensos apenas em meio de cultura completo e realizou-se a infecção de células NHDF em placas de 24 poços que retornaram para a estufa por mais 4 horas para iniciar o processo de invasão. Após o período de 2 horas, as lâminas foram fixadas e coradas para visualização em microscópio óptico de campo claro e quantificação.

Foi observado que a cepa TgCTBr5, mesmo utilizando concentrações maiores, obteve menor redução da invasão em relação à cepa TgCTBr8, sendo que para as concentrações 8,9 e 15 µM a inibição foi de 12 e 35 % respectivamente. Já a cepa TgCTBr8 obteve inibições

realizadas pelas concentrações 2,1, 4,2 e 7  $\mu\text{M}$ , respectivamente de 16, 47 e 56% (Figura 16). A análise estatística apresentou diferença significativa entre os ambos os ensaios.



**Figura 16:** Efeito do pré-tratamento com Lopinavir de taquizoítos de *T. gondii* das cepas TgBTBr5 e TgCTBr8 durante a invasão de células NHDF. Os resultados são a média de 3 experimentos independentes. \*  $P < 0,05$ , os resultados foram analisados pelo teste One-way ANOVA (Kruskal-Wallis).

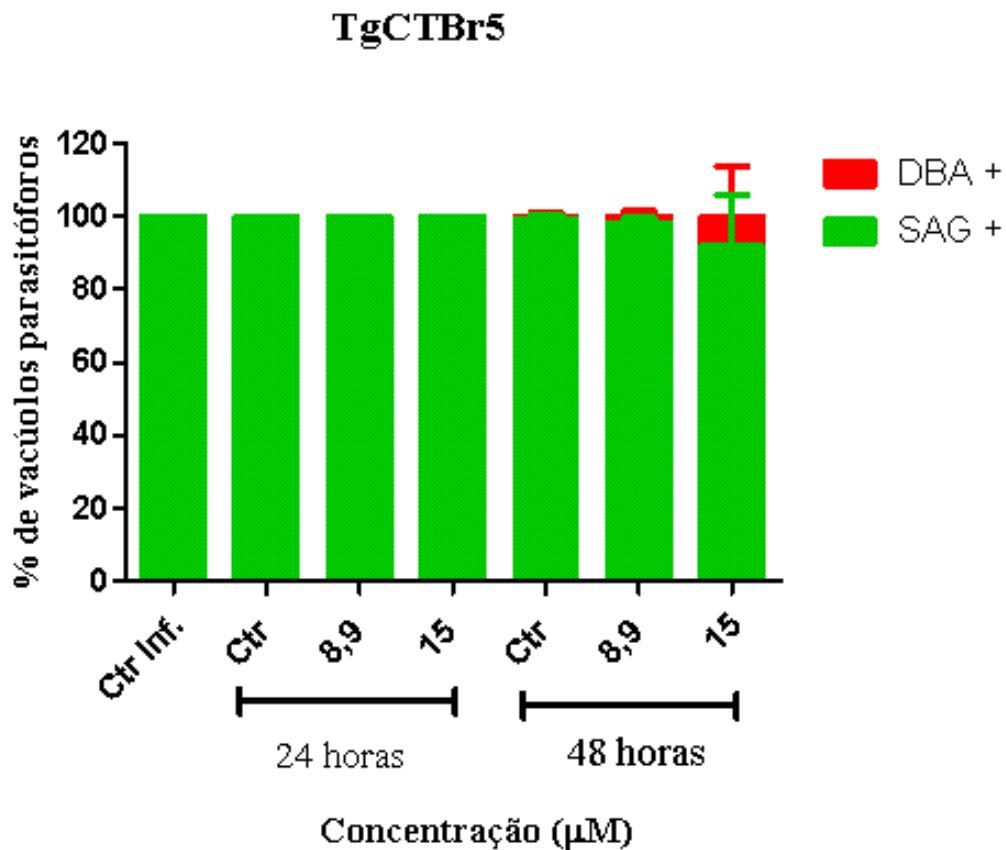
### 6.1.6 Avaliação do potencial cistogênico das cepas TgCTBr5 e TgCTBr8 de *T. gondii* mediante o tratamento *in vitro* com Lopinavir

Para a avaliação do potencial cistogênico foram realizados ensaios antiproliferativos de 24 e 48 h de tratamento, sendo que as concentrações de LPV utilizadas foram 8,9, 15  $\mu\text{M}$  para TgCTBr5 e 2,1 e 4,2  $\mu\text{M}$  para TgCTBr8. Também foram analisados um controle da infecção e dois controles para 24 e 48 h de interação sem nenhum tratamento.

Para a confecção de lâminas para visualização em microscópio óptico de fluorescência, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e marcadas com um anticorpo específico para taquizoítas (anti-SAG1) e o marcador de resíduos de N-acetilgalactosamina na parede cística DBA (lectina Dolichos biflorus), além da utilização do marcador DAPI para visualização dos núcleos celulares.

Avaliando o potencial cistogênico de cada cepa, foi observado que a cepa TgCTBr5 apresentou predominantemente vacúolos com taquizoítos durante os ensaios de 24 h e a partir de 48 h dos ensaios foi visualizada a presença de pouquíssimos cistos em células não tratadas, não chegando a 1% dos vacúolos quantificados. Em relação aos tratamentos de 48 h houve

um pequeno aumento do número de cistos em relação ao grupo controle, de 2 e 8% de vacúolos com cistos para as dosagens de 8,9 e 15  $\mu\text{M}$  respectivamente (Figura 17). Sendo possível afirmar que a maior dosagem utilizada no ensaio induziu a conversão de taquizoítos em bradizoítos num período de 48 horas de interação. A análise estatística não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos.

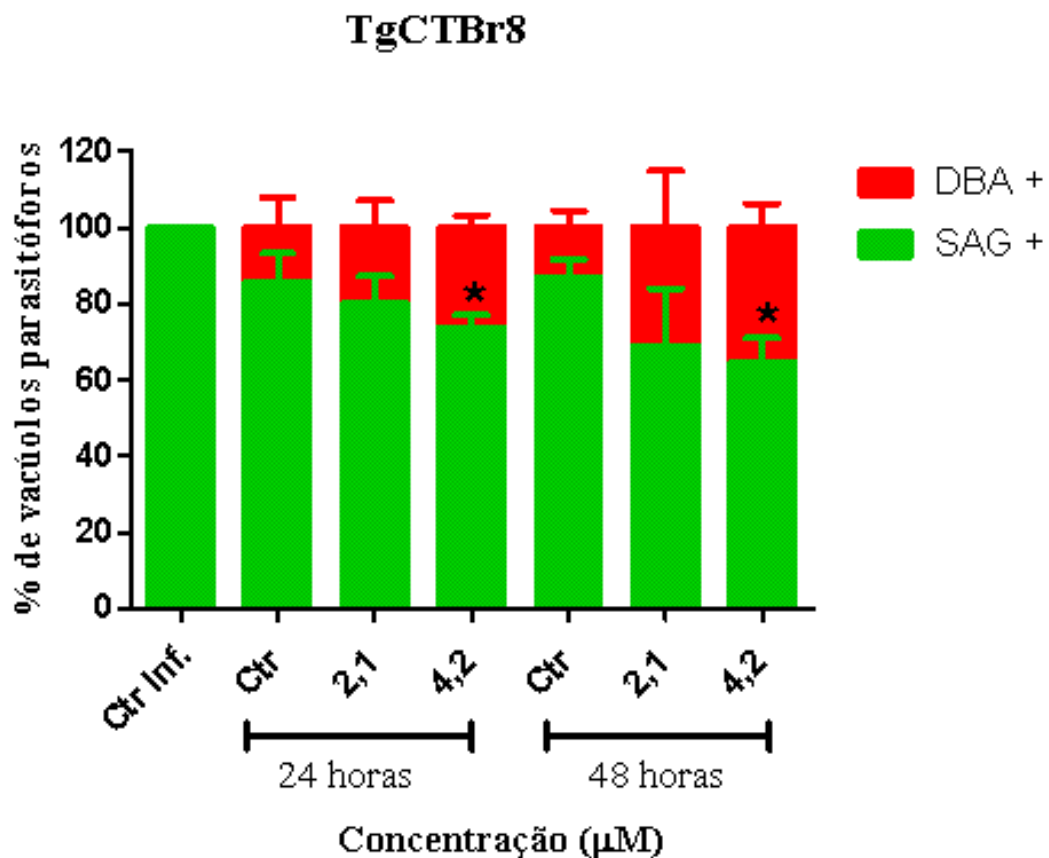


**Figura 17:** Avaliação do potencial cistogênico da cepa TgCTBr5 tratada ou não com Lopinavir, por um período de 24 a 48 horas, em células NHDF. Os resultados são a média de 3 experimentos independentes.  $p > 0,05$ , os resultados foram analisados pelo teste two-way ANOVA.

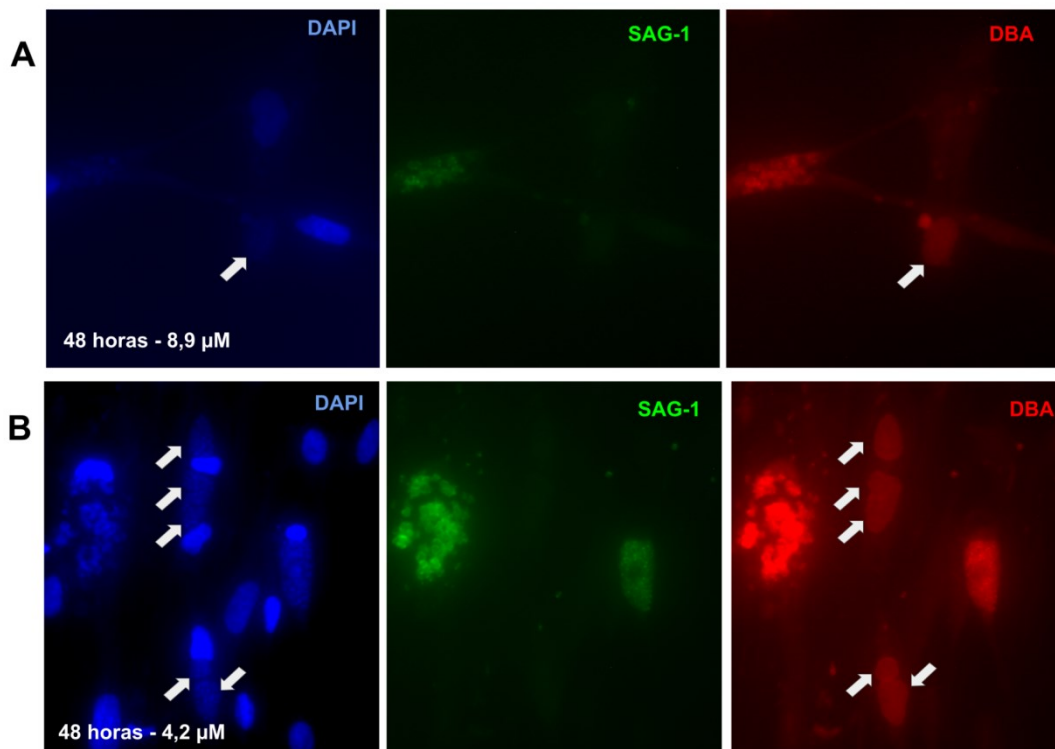
Em contrapartida, a cepa TgCTBr8, apresentou potencial cistogênico desde os ensaios com duração de 24 h, foi possível avaliar que neste período e também no ensaio de 48 h de interação dos parasitos com as células, sem a presença do fármaco, foram encontrados cerca de 14% de vacúolos analisados apresentando cistos. Já com a presença de LPV foi observado cerca de 20 a 26% e 31 a 35% de vacúolos marcados com DBA, para as concentrações 2,1 e 4,2  $\mu\text{M}$ , respectivamente, para os ensaios de 24 e 48 horas (Figura 18). A análise estatística

demonstra que houve diferença estatística significativa entre o controle da infecção e os tratamentos com 4,2  $\mu\text{M}$  de LPV em ambos os tempos.

É possível observar que a conversão de taquizoítos em bradizoítos parece estar diretamente relacionada com o aumento da concentração utilizada, pois para os controles não tratados de 24 e 48 horas a porcentagem de vacúolos DBA positivos analisados não houve diferença estatística significativa.



**Figura 18:** Avaliação do potencial cigogênico da cepa TgCTBr8 tratada ou não com Lopinavir, por um período de 24 a 48 horas, em células NHDF. Os resultados são a média de 2 experimentos independentes. (\*  $P < 0,0449$ ), os resultados foram analisados pelo teste two-way ANOVA.

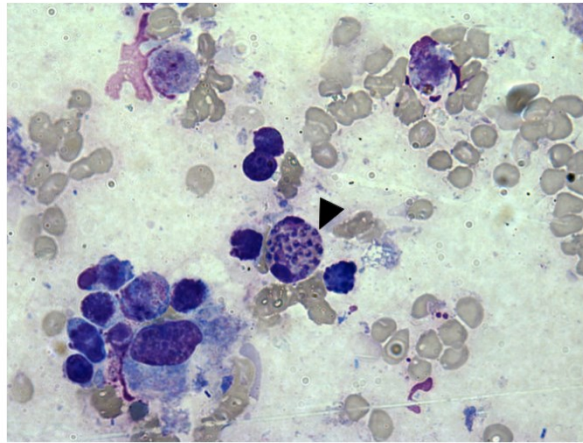


**Figura 19:** Representação da fluorescência no ensaio de cistogênese, onde DAPI é o marcador de núcleos tanto das células NHDF quanto de *T. gondii*, SAG-1 marcador da superfície de taquizoítos e DBA marcador de parede cística. (A) Cepa TgCTBr5 com 48 horas de tratamento na concentração de 8,9 µM de LPV. (B) Cepa TgCTBr8 com 48 horas de tratamento na concentração de 2,1 µM de LPV.

### 6.1.7 Avaliação do efeito de Lopinavir/Ritonavir e em associação com SDZ e PYR na fase aguda da toxoplasmose em modelo murino

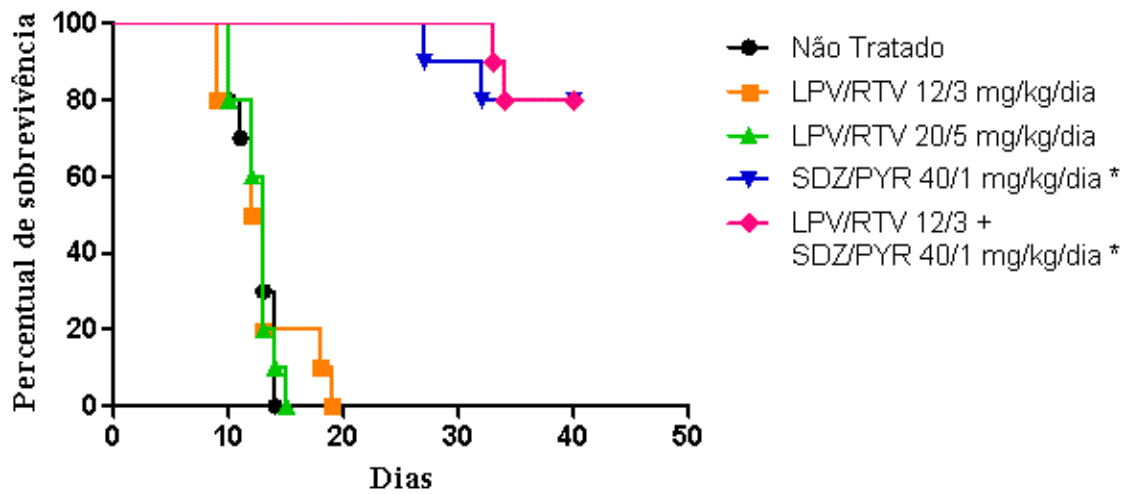
Os efeitos de LPV/RTV foram avaliados *in vivo* utilizando modelos murino das fases aguda (cepa TgCTBr8) e crônica (cepa TgCTBr5) da doença.

Na figura 21, pode-se observar o efeito de LPV/RTV isolado e em associação a SDZ/PYR em camundongos infectados por via intraperitoneal com  $10^4$  taquizoítos da cepa virulenta TgCTBr8. Os animais foram tratados por 10 dias após 1 dia de infecção e observados por mais 30 dias. Todos os animais que sucumbiram anteriormente aos 30 dias de observação tiveram seus pulmões analisados para detecção de taquizoítos e em todos foi constatada a Toxoplasmose aguda. Achado interessante foi o encontro de um cisto de bradizoítos no *imprint* pulmonar de um camundongo não tratado evidenciando a capacidade cistogênica desta cepa (Figura 20).



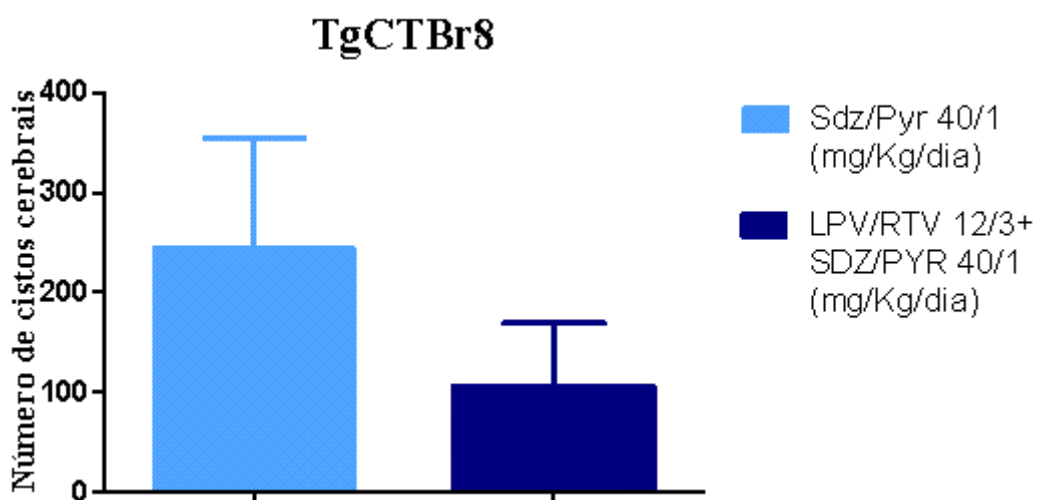
**Figura 20:** Cisto de *T. gondii* da cepa TgCTBr8 encontrado em *imprint* de pulmão em camundongo não tratado que não sobreviveu à fase aguda da Toxoplasmose.

Camundongos tratados apenas com LPV/RTV com doses de 12/3 mg/kg/dia obtiveram uma diferença na sobrevida de 4 dias em relação ao grupo controle e grupo tratado com 20mg/kg/dia. No entanto, quando LPV/RTV foi associado a 40mg/kg de SDZ e 1mg/kg de PYR, 80% dos animais sobreviveram ao tratamento e tiveram um aumento de mínimo 26 dias de sobrevida em relação ao grupo controle e de 6 dias com aqueles tratados apenas com 40mg/kg de SDZ e 1mg/kg de PYR, e que também obtiveram uma taxa de 80% de sobrevivência. A análise estatística pelo método Mantel-Cox logrank test demonstrou que a diferença entre os grupos não tratados e os tratados com as associações SDZ+PYR e LPV/RTV+SDZ/PYR é estatisticamente significativa (Figura 21).



**Figura 21:** Efeito do tratamento de 10 dias com diferentes doses de LPV/RTV e em associação com SDZ+PYR na sobrevivência de camundongos ( $n=10$  por grupo) suíços fêmeas infectados de forma aguda com  $10^4$  taquizoítos de *T. gondii* (cepa virulenta TgCTBr8) via intraperitoneal. O tratamento teve início 1 dia após infecção. Resultados foram avaliados pelo método Kaplan-Meier e comparados utilizando o log-rank (Mantel-Cox) teste. \*  $P < 0.0001$  vs. não tratado.

Os animais sobreviventes do ensaio agudo foram analisados e o número de cistos cerebrais quantificado (Figura 22) e foi observada uma redução de 56% dos cistos nos camundongos tratados com o LPV/RTV em associação com SDZ/PYR em relação aos tratados apenas com SDZ/PYR. A análise estatística demonstrou que a diferença entre os grupos tratados com as associações SDZ+PYR e L/R+SDZ/PYR não é significativamente estatística.

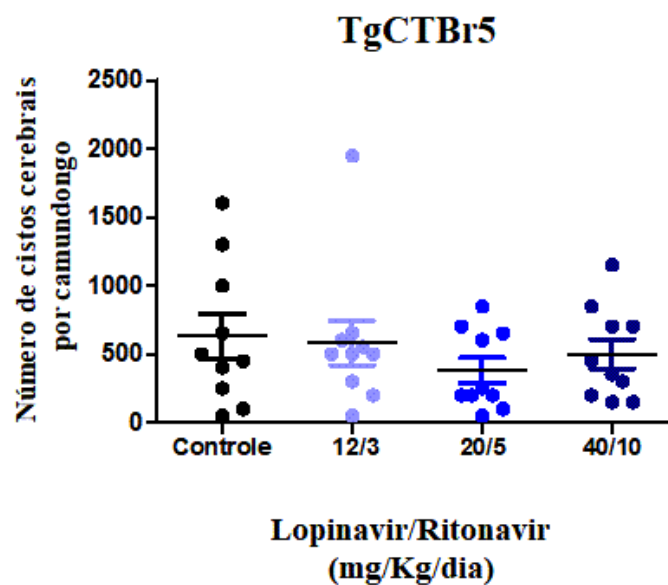


**Figura 22:** Avaliação do número de cistos cerebrais em camundongos infectados sobreviventes ( $n=8$  de cada grupo) de ensaio agudo (cepa TgCTBr8), 30 dias após o término do tratamento. Análise Mann Whitney test, no qual os resultados não obtiveram diferenças estatísticas significativas entre os grupos. ( $P > 0,05$ ).

### 6.1.8 Avaliação do efeito de Lopinavir/Ritonavir na fase crônica da toxoplasmose em modelo murino

Para avaliar a atividade de LPV/RTV na redução do número de cistos em modelo crônico da Toxoplasmose em camundongos, foram utilizados inóculos de 5 cistos da cepa TgCTBr5, do tipo avirulenta, por via oral, rota natural de infecção pelo parasito. Para simular a cronicidade da doença, após 21 dias de infecção deu-se início ao tratamento com duração de 21 dias por via oral.

A contagem dos cistos cerebrais foi realizada após o término do tratamento. Camundongos tratados com LPV/RTV 20/5 mg/kg/dia apresentaram redução de 40% dos cistos cerebrais em relação ao grupo controle. Enquanto camundongos tratados com as doses de 12/3 e 40/10 mg/kg/dia, obtiveram uma redução de 2 e 21% respectivamente (Figura 23). A análise estatística não apresentou diferença estatística significativa.



**Figura 23:** Avaliação de cistos cerebrais em camundongos infectados por via oral com 5 cistos da cepa TgCTBr5, tratamento iniciado após 21 dias de infecção e com duração também de 21 dias. Análise pelo teste one-way ANOVA (Kruskal-Wallis), onde os resultados não obtiveram diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados e o controle ( $P > 0,05$ ).

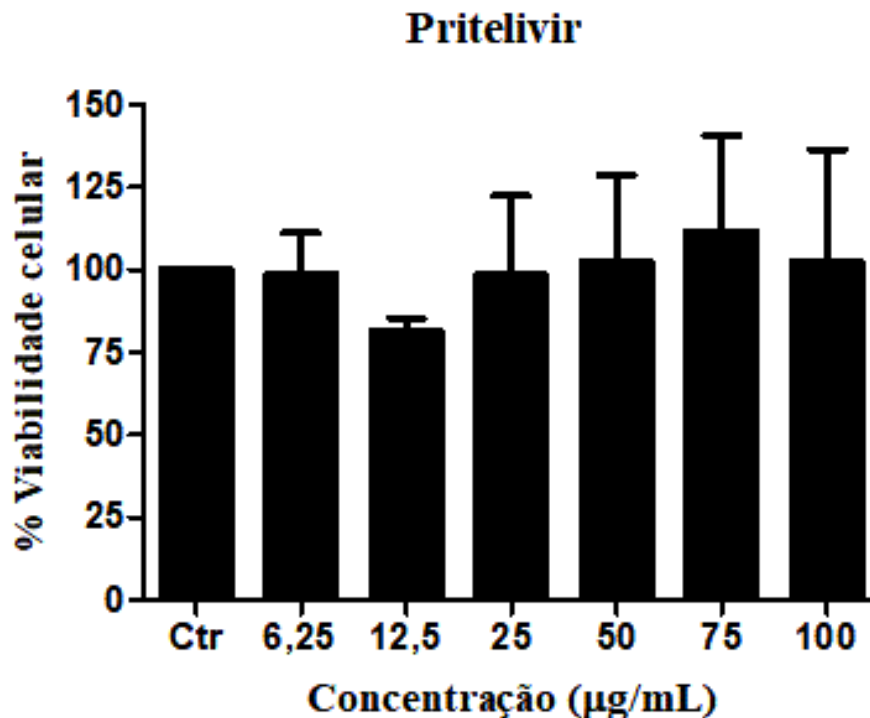
## 6.2 Parte II - Pritelivir

### 6.2.1 Avaliação da citotoxicidade de Pritelivir em células NHDF

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados através do método colorimétrico MTS/PMS, onde a viabilidade celular pode ser avaliada através da conversão dos sais de tetrazólio em formazan pela enzima succinato-desidrogenase mitocondrial em células viáveis e metabolicamente ativas.

Para a realização dos ensaios, placas de cultura de 96 poços foram semeadas com  $2 \times 10^5$  células e tratadas com diferentes concentrações 6,25; 12,5; 25; 50; 75 e 100  $\mu\text{g/mL}$  com PTV, por 7 dias. A absorbância foi avaliada em 490 nm, em leitor de microplaca Biotek, após 3h de incubação com os reagentes MTS/PMS, e a citotoxicidade calculada como a porcentagem de células viáveis em relação às células controle (não tratadas).

Os resultados nas análises em células HFF demonstraram que Pritelivir não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas (Figura 24).



**Figura 24:** Efeito citotóxico de Pritelivir em cultura de células NHDF após 7 dias de tratamento. O efeito citotóxico foi avaliado através do ensaio de MTS/PMS, onde Pritelivir não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas. Os resultados foram expressos como a média

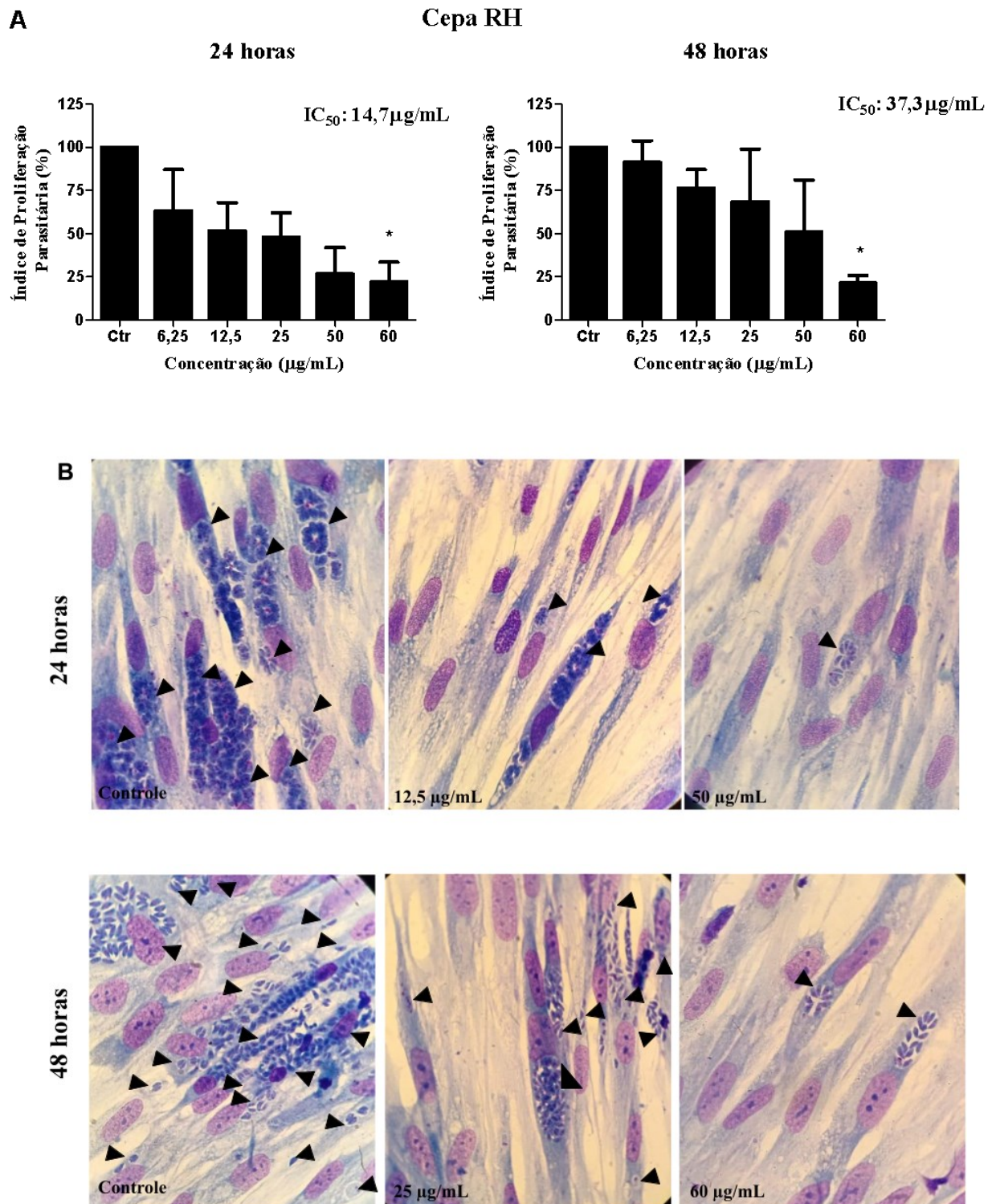
± desvio padrão de três experimentos independentes e analisados pelo teste one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) ( $p > 0,05$ ).

### **6.2.2 Avaliação do efeito antiproliferativo *in vitro* de Pritelivir na cepa RH de *T. gondii* e na cepa Y de *T. cruzi***

O efeito antiproliferativo de PTV em taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH foram avaliados em culturas de células NHDF previamente infectadas por 4 horas. Após este período, os parasitos extracelulares foram removidos por lavagem e as células foram tratadas por 24 e 48 h com diferentes concentrações de PTV: 6,25, 12,5, 25, 50 e 60 µg/mL. Ao término do tratamento, as células foram fixadas e coradas para visualização em microscopia óptica de campo claro.

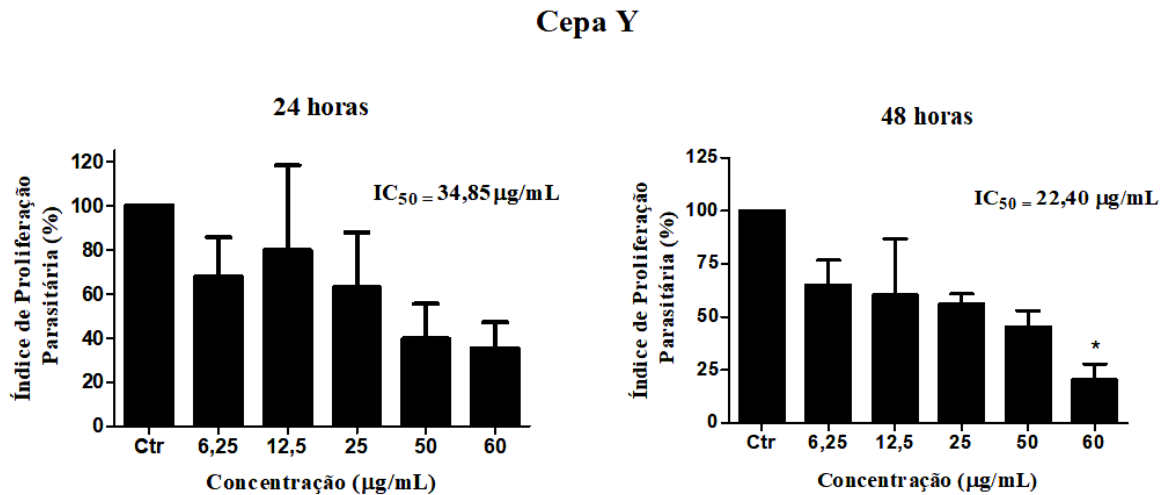
Foi observado uma relação dose dependente tanto no tratamento de 24 horas quanto no de 48 horas, PTV alcançou a concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) com o valor de 14,7 µg/mL ± 1,29 e inibiu a proliferação dos parasitos em de cerca de 73%, na concentração 50 µg para o tratamento de 24 horas. Já para o tratamento de 48 horas foi obtido o IC<sub>50</sub> de 34,03 µg/mL ± 6,92 e a concentração de 60 µg/mL reduziu a proliferação em cerca de 77% (Figura 25A).

Na figura 24B pode-se observar a diminuição da quantidade de parasitos intracelulares e número de células infectadas tratadas com concentrações próximas e/ou superiores ao IC<sub>50</sub> em relação ao controle.

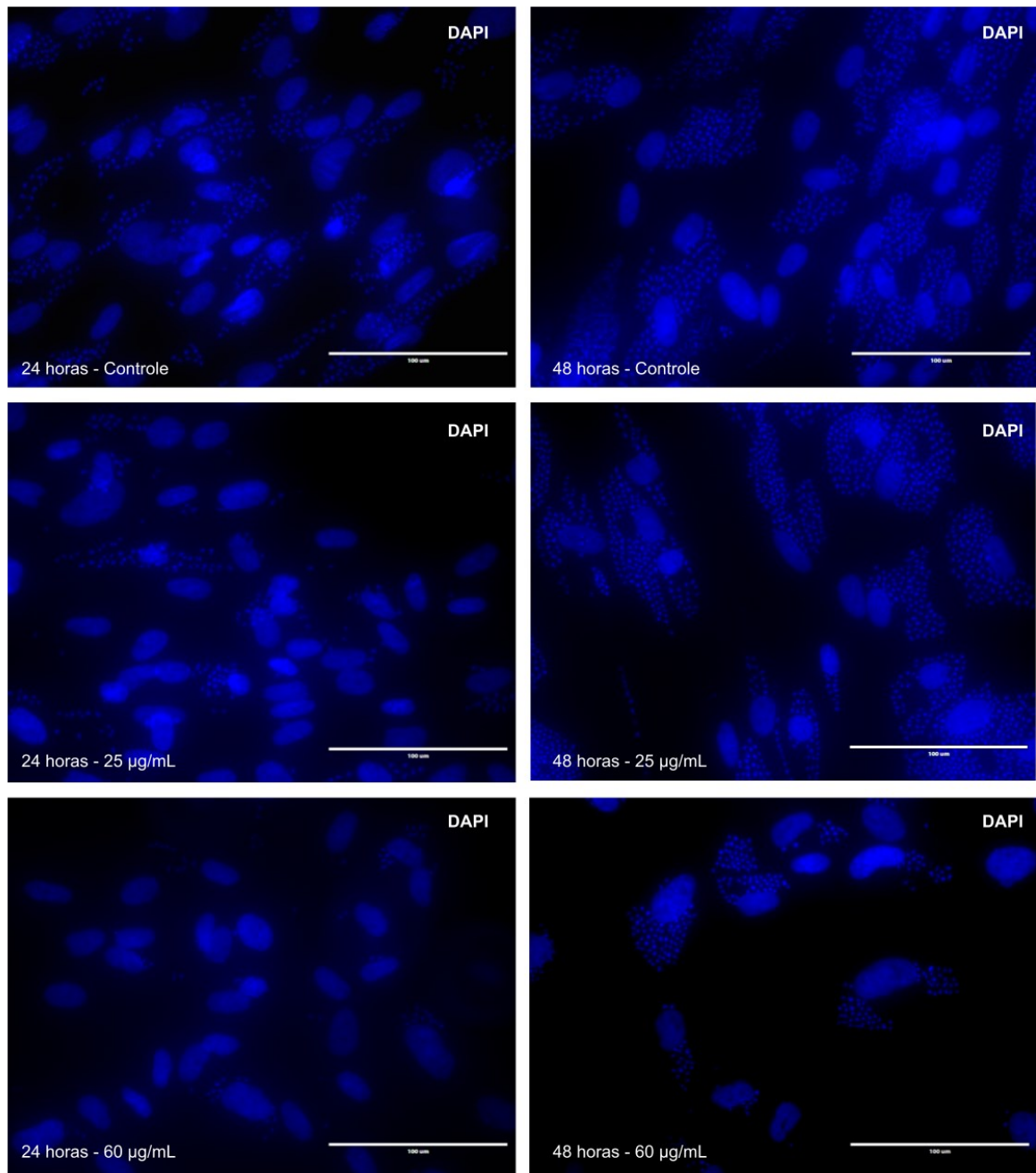


**Figura 25:** Efeito antiproliferativo de Pritelivir em taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* em células NHDF após 24 e 48 horas de tratamento (24h  $p = 0,0253$ ) (48h  $p = 0,0228$ ). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes e analisados pelo teste One-way ANOVA (Kruskal-Wallis). (B) As imagens foram obtidas através de lâminas coradas e fotografadas utilizando microscópio óptico de campo claro. 24 e 48 horas de tratamento, células não tratadas e tratadas. As pontas das setas indicam células infectadas.

O efeito antiproliferativo de PTV em amastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foi avaliado conforme descrito anteriormente, após 24 horas de interação com o fármaco observamos o  $IC_{50}$  no valor de  $34,85 \mu\text{g/mL} \pm 1,40$  e no tratamento de 48 horas foi obtido o valor de  $22,40 \mu\text{g/mL} \pm 1,29$  (Figura 26). Com inibição de 61 e 80% com a concentração de  $60 \mu\text{g/mL}$ , em 24 e 48 horas respectivamente (Figura 27). Os ensaios realizados em 24 horas não resultaram em diferença estatística significativa.



**Figura 26:** Efeito antiproliferativo de Pritelivir em amastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em células NHDF após 24 e 48 horas de tratamento (24 h  $p > 0,05$ ) (48 h  $p = 0,0190$ ). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes e analisados pelo teste One-way ANOVA (Kruskal-Wallis).



**Figura 27:** Efeito antiproliferativo de Pritelivir em amastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em células NHDF após 24 e 48 horas de tratamento. As imagens foram obtidas através de lâminas marcadas com DAPI e fotografadas utilizando microscópio EVOS.

## 7. Discussão

É de extrema importância a busca por alternativas para o tratamento da Toxoplasmose, pois como já mencionado, os tratamentos existentes são limitados pois possuem muitos efeitos adversos e apenas tratam a fase aguda da doença. Tem se buscado outra terapia que possa substituir a utilização da combinação SDZ+PYR, mas ainda nenhum fármaco foi desenvolvido para o tratamento da toxoplasmose, sendo então de extrema necessidade estudos que utilizam o reposicionamento como estratégia.

O tratamento da Doença de Chagas, causada pelo protozoário *T. cruzi*, também é muito complexo devido à sua toxicidade, baixa atividade na fase crônica da doença e falta de opções, sendo que os únicos dois fármacos atualmente disponíveis estão em administração há mais de 50 anos.

A realização de ensaios *in vitro* são importantes para a análise de compostos com atividade antiparasitária para que estes possam ser avaliados em ensaios *in vivo* para se observar o potencial do fármaco em modelo experimental da doença. Camundongos são utilizados tanto para avaliação da fase aguda quanto a crônica e fêmeas são mais susceptíveis a doença em relação aos machos, pois o gênero e hormônios sexuais parecem influenciar a resposta imune (Roberts *et al.*, 2001)

Em relação às cepas de *T. gondii*, na América do Norte e na Europa, as linhagens clonais do parasito já estão bem elucidadas como: tipo I, como a RH, altamente virulenta, mais relacionada a TC; tipo II, como a ME49, avirulenta, linhagem mais encontrada em humanos e bem relacionada à reativação em pacientes com SIDA e tipo III, como a VEG, mais comum em animais (Howe & Sibley, 1995; Saeij *et al.*, 2005). Destas linhagens clonais, neste trabalho foi utilizada a cepa RH.

As cepas do hemisfério sul por apresentarem diferenças genéticas em relação às cepas clonais do hemisfério norte, foram caracterizadas como atípicas. A população de *T. gondii* no Brasil é altamente diversa, essas linhagens são designadas como Tipos BrI, BrII, BrIII e BrIV. A análise das taxas de mortalidade em camundongos infectados indica que o Tipo BrI é altamente virulento, o Tipo BrIII não é virulento, enquanto as linhagens do Tipo BrII e BrIV são de virulência intermediária. Assim, *T. gondii* possui uma estrutura populacional epidêmica no Brasil e as principais linhagens apresentam características biológicas distintas

(Khan *et al.*, 2006; Pena *et al.*, 2008) sendo de extrema importância os estudos destas cepas para elucidação de comportamento do parasito e possíveis associações que possam influenciar na compreensão da patologia da doença, já que casos de TO e TC no Brasil se classificam como muito graves (Khan *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2012).

A cepa brasileira TgCTBr8 (genótipo#11) utilizada neste trabalho foi classificada como virulenta e pertence ao tipo BrII e a cepa TgCTBr5 (genótipo#8), tipo BrIII, classificada como avirulenta, ambas foram obtidas de pacientes com TC do estado de Minas Gerais (Carneiro *et al.*, 2013).

*T. cruzi* apresenta um modelo de evolução predominante clonal, o termo DTU (*Discrete Typing Units*) foi proposto para descrever conjuntos de cepas que são geneticamente mais semelhantes entre si, onde encontramos as linhagens TcI - TcVI e Tcbat (Zingales *et al.*, 2012). A cepa utilizada neste trabalho é a Y, classificada como TcII, associada a infecção de humanos ou encontrada em vetores que co-habitam espaços domésticos.

Como alternativa aos tratamentos atuais de doenças parasitárias, a utilização de antibióticos, antifúngicos e antivirais em pesquisas de reposicionamento é uma estratégia. Medicamentos atuais utilizados para o tratamento da Toxoplasmose são todos reposicionados. Os antivirais têm recebido bastante atenção, como seu uso em pacientes com SIDA têm demonstrado uma queda drástica de casos de encefalite toxoplásmica, importante quadro oportunista nestes pacientes (Pozio *et al.*, 2005; Alfonso *et al.*, 2011; Monzote *et al.*, 2013; Vidal & Oliveira, 2013).

Com o objetivo de encontrar possíveis compostos para o tratamento da toxoplasmose, foram utilizadas abordagens *in vitro* e *in vivo* para avaliar a atividade anti-*Toxoplasma* do antirretroviral Lopinavir. E como outra alternativa, avaliamos o antiviral Pritelivir como possível candidato ao tratamento da doença de Chagas e Toxoplasmose e a abordagem utilizada nestes ensaios foi o método *in vitro*.

## 7.1 Lopinavir

Lopinavir é um antirretroviral amplamente utilizado no tratamento da SIDA, é um inibidor de protease, mais especificamente da aspartil protease, importante enzima pois sua inibição produz vírus imaturos e não infecciosos, impedindo a clivagem de proteínas estruturais e funcionais (Cvetkovic & Goa, 2003). Em *T. gondii* são codificadas 7 aspartil proteases (ASPs), com ASP1, ASP3 e ASP5 sendo expressos significativamente no estágio de taquizoíto (Polonais *et al.*, 2011; Dogga *et al.*, 2017).

LPV sofre rápido metabolismo de primeira passagem no fígado pelo citocromo CYP3A4 e CYP3A5. Em sua formulação original, ele é comercializado em associação com o Ritonavir, não por sua ação antirretroviral, mas porque inibe enzimas que metabolizam os fármacos inibidores da protease. RTV inibe a enzima CYP3A4 o que resulta em concentrações plasmáticas maiores de LPV quando os dois medicamentos são co-administrados. Sendo assim, apenas nos ensaios *in vivo*, LPV foi administrado combinado com RTV.

De forma a selecionar concentrações não tóxicas de LPV para os ensaios antiproliferativos com *T. gondii*, foram realizados primeiramente os ensaios citotoxicidade pelo método do MTS/PMS. Neste trabalho foram testadas diferentes concentrações do fármaco para a avaliação da viabilidade celular em células hospedeiras, no caso fibroblastos humanos NHDF. As células estiveram em contato com o fármaco durante 7 dias de tratamento e foi observado um efeito citotóxico em 50% das células na concentração de  $21,1\mu\text{M} \pm 1,02$  sendo que a concentração máxima utilizada,  $50\mu\text{M}$ , diminuiu em 96% a viabilidade celular.

Sangenito e col. (2016) demonstraram uma tolerância das células LLC-MK2 em ensaios com LPV com  $\text{CC}_{50}$  superior a  $400\mu\text{M}$ , num período de 4 horas de tratamento e o efeito citotóxico deste fármaco também foi avaliado por Mahdi e colaboradores (2020) em células de rim de embrião humano (T HEK-293) onde obteve alta citotoxicidade observada apenas em concentrações acima de  $50\mu\text{M}$  (90%) num período de 24 horas de tratamento.

Pode-se então observar que o efeito citotóxico do Lopinavir após 24 horas de tratamento, no estudo mencionado, se manteve semelhante, sem elevação, em relação ao tratamento de 7 dias, demonstrando uma grande tolerância e segurança.

Em conjunto com os resultados antiproliferativos e de viabilidade celular apresentados neste trabalho contra as cepas TgCTBr5 e TgCTBr8 foi possível avaliar o SI, onde o fármaco foi 10 vezes mais seletivo para a cepa TgCTBr8 e 2,4 vezes mais seletivo para a cepa TgCTBr5 do que para células NHDF. O que demonstra que o fármaco desempenha ação seletiva no protozoário e não em células humanas.

Etapas do ciclo lítico, como invasão e proliferação intracelular, além da habilidade de converter-se em bradizoítos encistados como mecanismo de escape imunológico são importantes para a compreensão da virulência e da patogênese de *T. gondii*. Neste estudo avaliou-se as características fenotípicas associadas à infectividade (invasão e proliferação) e encistamento na presença de LPV.

Foram realizados ensaios proliferativos para determinar a capacidade de inibição de LPV contra duas cepas brasileiras TgCTBr8 e TgCTBr5, para isto, taquizoítos recém egressos foram permitidos a infecção de células NHDF por um período de 24 horas. Após esta interação, foi realizado o tratamento com concentrações de 1 a 15  $\mu\text{M}$  por um período de 24 horas. Foram encontrados valores de  $\text{IC}_{50}$  de  $2,1 \pm 1,17$  e  $8,9 \pm 1,05$   $\mu\text{M}$  para as cepas TgCTBr8 e TgCTBr5 respectivamente e uma drástica redução da proliferação, superior a 70%, a partir de 7  $\mu\text{M}$  para TgCTBr8 e 15  $\mu\text{M}$  para TgCTBr5.

Nossos resultados corroboram com outros estudos realizados *in vitro* com LPV que foi ativo contra 4 diferentes cepas de *Plasmodium falciparum*, obtendo valores de  $\text{IC}_{50}$  entre 0,9 a 2,1  $\mu\text{M}$  (Parikh *et al.*, 2005), e outros inibidores de proteases, como RTV e Nelfinavir contra a cepa RH de *T. gondii* também obtiveram valores entre 5,4  $\mu\text{g/ml}$  e 4,0  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente (Derouin & Santillana-Hayat, 2000).

Ensaio de invasão também foram realizados para avaliar o comportamento das cepas ao pré-tratamento com o fármaco, com o intuito de verificar se esta poderia prejudicar esta importante etapa do ciclo do parasito. Taquizoítos permaneceram em contato por 2 horas com seguintes as concentrações de LPV: 2,1; 4,2 e 7  $\mu\text{M}$  para TgCTBr8 e 8,9 e 15  $\mu\text{M}$  para TgCTBr5, após este período o fármaco foi retirado por centrifugação e os parasitas foram colocados para interagir por 2 horas com células NHDF para que pudessemos determinar o número de células infectadas. A cepa TgCTBr5 apresentou máxima inibição de 35% com a concentração de 15  $\mu\text{M}$  em relação ao grupo controle. Já a cepa TgCTBr8 foi mais suscetível ao pré-tratamento, onde a taxa de inibição da invasão chegou a 56% na concentração de 7

$\mu\text{M}$ , em relação ao grupo controle. Ambas as cepas apresentaram redução da invasão e da proliferação, podendo então sugerir interferência/inibição de proteínas tanto relacionadas à invasão quanto à manutenção do parasito intracelular. Este resultado pode corroborar com outros estudos realizados com LPV em *P. falciparum*, este protozoário possui 10 tipos de proteases aspárticas, chamadas “plasmepsinas”, sugerindo que o alvo sejam estas enzimas, a redução da carga parasitária foi observada tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Skinner-Adams *et al.*, 2004; Parikh *et al.*, 2005; Sonoiki *et al.*, 2017). Andrews e col. (2006) obtiveram efeitos significativos sobre a morfologia dos parasitos *P. falciparum*, na digestão de hemoglobina e através de ensaios contra as enzimas PfPM-II e PfPM-IV recombinantes comprovaram a inibição destas plasmepsinas com a utilização de LPV.

A cepa TgCTBr8 apresentou menores taxas de invasão em 2 h de interação e exibiu menor atividade proliferativa, em relação a cepa TgCTBr5. O egresso dos taquizoítos de um vacúolo para invasão de novas células, inicia um novo ciclo de proliferação (Eidell *et al.*, 2010), se não há saída da célula, os vacúolos tendem ao encistamento como resposta às condições do ambiente intra e extracelular (Sullivan & Jeffers, 2012). Situação esta que pode justificar os resultados dos ensaios de conversão taquizoíto-bradizoíto da cepa TgCTBr8 onde mesmo em condições normais de cultivo foi observado o início da cistogênese espontânea após 24 e 48 horas sem tratamento, 15 e 13% de vacúolos DBA positivos, respectivamente. Dado também observado por Barbosa (2015) na cepa TgCTBr9, também classificada como virulenta, onde realizou os estudos em neurônios e células da glia. Nossos resultados também corroboram com os achados sobre a cistogênese espontânea da cepa EGS, cepa brasileira virulenta, que foi avaliada em células LLC-MK2 onde apresentou  $60,3 \pm 16,3\%$  de cistos DBA positivos em relação a  $6,4 \pm 3,2\%$  da cepa avirulenta ME49 (Paredes-Santos *et al.*, 2013).

A conversão dos taquizoítos em bradizoítos também continuou a ser observada de forma dose dependente nos tratamentos com LPV onde cerca de 20 a 26% e 31 a 35% de vacúolos continham bradizoítos, para as concentrações 2,1 e 4,2  $\mu\text{M}$ , nos ensaios de 24 e 48 horas, respectivamente. Segundo Ferreira da Silva e col. (2008), quimioterápicos que diminuem drasticamente a replicação do *T. gondii* e evitam a manifestação clínica da doença em pacientes infectados podem, ao mesmo tempo, induzir a expressão de antígenos específicos de bradizoítos e consequente persistência do parasito, como observado com a utilização de tratamentos a base SDZ+PYR e atovaquona (Gross & Poh, 1996; Sullivan & Jeffers, 2012). Portanto, essa característica cistogênica da cepa TgCTBr8 pode estar

relacionada tanto com a sua menor capacidade de invasão e proliferação natural quanto induzida pelo tratamento com o LPV.

Em contrapartida, a cepa TgCTBr5 apresentou maiores taxas de invasão e proliferação, mas o início da conversão de taquizoítos espontânea em bradizoítos apenas foi observada no controle de 48 horas não tratado, com apenas 1% dos vacúolos com bradizoítos e no grupo tratados com 48 horas a 8,9 e 15  $\mu$ M foram observados a conversão de apenas 2 e 8% dos vacúolos, respectivamente. Sugerindo-se que nesta cepa a cistogênese espontânea não é uma característica, num período inferior a 48 horas de observação, devido à sua intensa proliferação e rápido ciclo intracelular, mas sim, a conversão induzida pela presença do fármaco.

Os resultados envolvendo invasão, proliferação e capacidade de conversão taquizoíto-bradizoíto obtidos com as cepas atípicas brasileira TgCTBr8 e TgCTBr5, classificadas como virulenta e avirulenta respectivamente, neste estudo, se diferem de alguns resultados obtidos com cepas de linhagens clonais virulentas como a RH, onde apresentam uma maior capacidade de invasão proliferação e menor conversão de taquizoítos a bradizoítos, e de linhagem avirulentas como a ME49 que apresentam menor capacidade de invasão e proliferação, porém maior conversão a bradizoítos (Howe 1997; Radke, *et al.*, 2001).

No entanto, estudos que elucidaram estas três sequências de acontecimentos em três cepas virulentas RH, Martin e ENT, demonstraram variações neste padrão até mesmo em cepas de mesma linhagem, onde as cepas RH e Martin invadiram e proliferaram menos em relação à cepa ENT, mas em relação à cistogênese, a cepa Martin apresentou maior quantidade de vacúolos convertidos à bradizoítos (Appleford & Smith, 1997). E ainda, cepas isoladas na Ásia e na América do Sul, como as utilizadas neste trabalho, parecem exibir um padrão diferente, mostrando genótipos recombinantes que juntam as duas características: a virulência e a capacidade cistogênica em camundongos (Saeij *et al.*, 2005).

Sendo assim, é necessário que sejam realizados experimentos com as cepas atípicas brasileiras utilizadas neste trabalho e outras cepas brasileiras de *T. gondii* tanto virulenta, avirulentas e de virulência intermediária, para que se possa realizar uma análise comparativa deste comportamento *in vitro* e também relacioná-los com o comportamento caracterizado *in vivo*.

Para conhecer a suscetibilidade *in vitro* das cepas TgCTBr8 e TgCTBr5 ao tratamento padrão da Toxoplasmose foram realizados ensaios proliferativos com taquizoítos recém egressos que foram permitidos a infecção de células NHDF durante 24 horas, após este período de interação as células foram lavadas para retirada de parasitos extracelulares e foi realizado o tratamento com concentrações de PYR a 0,025 - 0,4  $\mu$ M combinadas com SDZ a 6,25 - 100  $\mu$ M por mais 24 horas.

Como resultado obtivemos valores para a cepa TgCTBr5 do IC<sub>50</sub> para SDZ, 8,9  $\mu$ M, e para PYR 0,035  $\pm$  1,20  $\mu$ M. Para a cepa TgCTBr8, obtivemos IC<sub>50</sub> de 30,35 e 0,121  $\pm$  1,13  $\mu$ M para SDZ e PYR respectivamente.

Apesar da elevação do IC<sub>50</sub> da SDZ na cepa TgCTBr8 em relação ao Lopinavir (2,1  $\mu$ M), nenhum dos valores de IC<sub>50</sub> obtidos com SDZ ou PYR nas duas cepas estão relacionados à resistência. Segundo Maneceur e col. (2008) em estudo de suscetibilidade realizado com 16 diferentes cepas, inclusive atípicas, através de médias de IC<sub>50</sub> obtidos, foi sugerido que a resistência para SDZ seja indicada para cepas em que o IC<sub>50</sub> seja superior a 50mg/L ou 200  $\mu$ M e para PYR acima de 0,52 mg/L ou 2,09  $\mu$ M, e ainda, estudos *in vivo* demonstraram suscetibilidade desta cepa a SDZ (Silva *et al.*, 2017).

Para melhor análise do comportamento destas cepas mediante tratamento combinado de SDZ e PYR seria interessante a realização de ensaios para análise da conversão de taquizoítos a bradizoítos na presença desta combinação para que se possa ter dados mais robustos que possam ajudar a esclarecer estas diferenças entre os IC<sub>50</sub>'s.

Os efeitos da combinação de lopinavir com o tratamento padrão para a toxoplasmose também foram avaliados, sendo utilizadas concentrações constantes de LPV de 0,625 associado a 1,25  $\mu$ M com SDZ (6,25, 12,5, 25, 50 e 100  $\mu$ M) e PYR (0,025, 0,05, 0,1, 0,2 e 0,4  $\mu$ M).

Para a cepa TgCTBr8 os resultados demonstraram uma não interação entre os fármacos, em nenhuma das concentrações de LPV associadas, 0,625 e 1,25  $\mu$ M, não havendo efeito sinérgico, aditivo ou antagonista entre elas, como descrito por Derouin & Santillana-Hayat (2000) que também chegaram a esta conclusão *in vitro* com a combinação sulfadiazina e pirimetamina associadas a vários antirretrovirais também inibidores de protease utilizados no tratamento do HIV, como nelfinavir, ritonavir e indinavir, contra a cepa RH de *T. gondii*. Ainda que a cepa TgCTBr8 não tenha apresentado resultados antagonísticos em relação a esta

combinação, foi observado um aumento na proliferação parasitária com a utilização da concentração de 1,25  $\mu\text{M}$  em relação ao ensaio com 0,625  $\mu\text{M}$  de Lopinavir e consequentemente uma elevação do  $\text{IC}_{50}$  de 18,11  $\mu\text{M}$  para 39,37  $\mu\text{M}$  para a SDZ.

Fato este que também foi observado na combinação de LPV com SDZ e PYR contra a cepa TgCTBr5, ensaios onde foram utilizados 0,625  $\mu\text{M}$  de lopinavir também não apresentaram interação entre os fármacos, mas os que foram utilizados 1,25  $\mu\text{M}$  de Lopinavir houve confirmação da ação antagonista entre elas causando um aumento da proliferação parasitária no grupo tratado com as concentrações mais inferiores de SDZ e PYR, 6,25 e 0,025 respectivamente (como observado na cepa TgCTBr8) em relação ao grupo controle não tratado e consequente elevação do  $\text{IC}_{50}$ , de 14 para 52,68  $\mu\text{M}$  de SDZ . Resultados semelhantes à este foram observados em estudos com o antirretroviral zidovudina, associados à SDZ e PYR, onde o aumento da concentração de zidovudina e a diminuição das concentrações dos antifolatos levou ao aumento da proliferação parasitária, sinalizando o antagonismo (Israelski *et al.* 1989).

Para avaliar os efeitos *in vivo* de LPV, foram realizados ensaios de fase aguda e crônica em camundongos. Como mencionado anteriormente, nos ensaios *in vivo*, LPV seria combinado com o RTV, as doses iniciais utilizadas são as mesmas recomendadas para o uso em crianças de 06 meses a 12 anos de idade, 12/3 mg/kg, e o aumento das doses ocorreram sempre na proporção de 4:1 (LPV/RTV) (Cvetkovic & Goa, 2003).

Nos ensaios agudos, camundongos foram infectados com  $10^4$  taquizoítos via i.p e 1 dpi teve início ao tratamento oralmente por gavagem, por 10 dias, exceto o grupo controle. Nenhum animal do grupo não tratado e tratados com 12/3 mg/kg/dia e 40/1 mg/kg/dia de LPV/RTV, sobreviveram, sendo que o último animal sucumbiu aos 19 dpi.

Hobbs e col. (2009) em ensaios que demonstraram a eficácia de LPV/RTV contra a fase exoeritrocítica do *P. bergeri* diminuindo em 55% a carga parasitária hepática de camundongos, utilizaram doses maiores que as usadas para atingir a eficácia terapêutica para o tratamento do HIV em humanos, na proporção 2:1 de LPV/RTV. Estudo feito por Kumar e col. (2004) mostra que a meia-vida e os níveis de estado estacionário de LPV/RTV sejam mais curtos em camundongos do que em humanos, portanto, a utilização de doses mais altas desses fármacos em modelos de murinos seria recomendada para alcançar concentrações que podem ser comparadas com os níveis alcançados em humanos

A partir dos resultados obtidos neste ensaio e pelos estudos anteriormente citados, pode-se sugerir a adequação da dosagem diária de tratamento para possível, interferindo na proliferação dos parasitos, levando à sobrevivência dos animais. Outro parâmetro que podemos observar seria a forma de administração, como observado por Kumar e col. (2004), a administração Martynowicz e col. (2019) concluíram que a forma de administração injetável diminuiu o número de taquizoítos e cistos em relação a gavagem e a administração diretamente pela comida, em estudo com fase aguda e crônica da toxoplasmose utilizando medicamento para hipertensão.

Além do ensaio com LPV/RTV, associamos estes fármacos com SDZ+PYR e também utilizamos a combinação padrão do tratamento da Toxoplasmose isolada. Nos dois experimentos, houve 80% de sobrevivência dos animais, sendo que o grupo tratado com a associação teve um tempo maior de sobrevida em relação ao grupo SDZ+PYR, mas não houve diferença estatística significativa entre eles.

Silva e col. (2017), já haviam demonstrado que a cepa TgCTBr8 era suscetível ao tratamento com SDZ e apresentou sobrevivência de 100, 80 e 100% para tratamentos com 80, 160, e 320 mg/Kg/dia do fármaco, sendo assim, podemos associar os resultados obtidos *in vitro* com os resultados *in vivo*, onde a associação de LPV/RTV com SDZ+PYR não demonstrou interação nestas dosagens.

Como *T. gondii* pertence ao filo Apicomplexa, mesmo filo do parasito causador da malária, pode-se sugerir ensaios com as mesmas combinações de tratamentos, pelo seu parentesco evolutivo com *Plasmodium spp.* Mas é importante ressaltar que no estudo feito por Abiodun e col. (2014), observou-se uma menor sobrevivência de animais experimentais no grupo de tratamento artemeter/lumefantrina associadas ao LPV/RTV, infectados com *P. bergeri*. E corroborando com estes resultados, Byakika-Kibwika e col. (2014), concluíram com ensaios em pacientes adultos com HIV, a co-administração de artemeter / lumefantrina com LPV/RTV aumentou significativamente a exposição de lumefantrina, mas diminui a exposição ao artemeter, destaca-se então a necessidade de cautela do uso desta associação em pacientes com HIV e acometidos também pela malária.

Por outro lado, Abiodun e col. (2016) em ensaios envolvendo os antimaláricos, amodiaquina e artesunato associados a LPV/RTV, obtiveram aumento na sobrevivência dos

animais de 20 para 60% (amodiaquina + LPV/RTV) e de 0 para 20% (artesunato + LPV/RTV) até 20 dpi.

Estudos com inibidores de protease associados com RTV, ou este de forma isolada, confirmam que há o aumento das concentrações plasmáticas de alguns antimaláricos pela inibição da enzima CYP3A4, realizada pelo RTV, potencializando seus efeitos (Andrews *et al.*, 2006; Hobbs *et al.*, 2009), mas como descrito anteriormente, podendo ser antagônico para outros. É necessário compreender até que ponto este aumento da meia-vida do fármaco no organismo poderia influenciar na resistência do *Plasmodium spp.* e outros organismos.

Ainda como resultado deste ensaio de associação *in vivo*, realizamos a contagem dos cistos cerebrais dos animais sobreviventes para analisar se haveriam diferenças entre as terapias, houve uma redução de 56% dos cistos do grupo tratado com LPV/RTV+SDZ/PYR em relação ao grupo tratado apenas com SDZ/PYR. Estes dados sugerem que LPV/RTV pode não ter sido efetivo na sobrevivência dos animais, mas tem relação com a diminuição da carga parasitária, em associação com SDZ+PYR, pois RTV pode ter aumentado o tempo de exposição dos anti-folatos no organismo do animal.

Silva e col. (2019) realizaram ensaios para determinar a suscetibilidade de cepas atípicas encontradas em casos de TC, entre elas a cepa TgCTBr9, de mesmo genótipo da cepa em estudo, TgCTBr8. E observaram que TgCTBr9 foi altamente suscetível a doses SDZ e PYR combinadas, 10 mg/kg e 3.13 mg/kg, respectivamente e ao fim do ensaio nenhum cisto cerebral foi encontrado em nenhum dos animais. Podemos observar que cepas de mesmo genótipo podem se comportar de maneiras diferentes quanto à cistogênese por indução de fármaco.

No ensaio crônico, foi utilizada a cepa TgCTBr5, inicialmente seguimos o protocolo estabelecido por Pinheiro e col. (2014), onde 10 cistos foram inoculados por gavagem. Era esperado que estes camundongos sobrevivessem pelo menos após 30 dpi., mas surpreendentemente em menos de 10 dias todos sucumbiram à infecção. Um cisto jovem pode conter de 2 bradizoítos, enquanto os mais velhos podem conter de 1000 a 2000 bradizoítos, portanto, como a ingestão é controlada apenas em número de cistos e não de bradizoítos, podemos ter uma diferença muito grande no inóculo a nível de infecção, mesmo os animais doadores dos cistos tendo o mesmo tempo de infecção (Dubey *et al.*, 1998).

A partir do ocorrido, utilizamos o inóculo de 5 cistos por camundongo, estes animais permaneceram sem tratamento por 21 dias, para a cronificação da doença. Após este período receberam tratamento de LPV/RTV nas doses de 12/3, 20/5 e 40/10 mg/kg/dia, por 21 dias.

Camundongos tratados com LPV/RTV 20/5 mg/kg/dia apresentaram redução de 40% dos cistos cerebrais em relação ao grupo controle, não houve diferença estatística, mas como mencionado anteriormente o inóculo de cistos pode variar a carga parasitária dos indivíduos nos grupos, o que sugere ação LPV/RTV diretamente nos bradizoítos. Outro dado observado neste ensaio crônico é relacionado a solubilidade de LPV/RTV, RTV é considerado um fármaco de baixa solubilidade (Sinha *et al.*, 2010), na dosagem de 40/10mg/kg a dificuldade da solubilização no veículo carboximetilcelulose, pode ter prejudicado a biodisponibilidade do fármaco, pois encontramos um número maior de cistos neste grupo.

Nossos resultados sugerem que LPV/RTV é um promissor candidato ao tratamento da Toxoplasmose aguda, na utilização em combinação com o tratamento padrão e uma alternativa no tratamento crônico da doença. E propomos novos estudos com adequação de dosagens e formas de administração para avaliação de melhores resultados tanto na forma aguda quanto crônica da doença.

## 7.2 Pritelivir

O complexo helicase-primase desempenha um passo inicial na síntese de DNA para separar a fita dupla vital em duas fitas simples (bifurcação de replicação) e é um novo alvo da terapia antiviral.

Pritelivir (PTV) o primeiro em uma nova classe de agentes antivirais que inibe a replicação do HSV, tipo 1 e 2 e também contra mutantes do HSV-1, ao se direcionar ao complexo viral helicase-enzima primase. Ao contrário dos análogos de nucleosídeos, PTV não requer ativação por fosforilação da enzima timidina quinase (fator necessário para aciclovir, medicamento mais utilizado para o tratamento da herpes-simplex) e ainda é ativo em células não infectadas, (Wald *et al.*, 2014; Birkmann & Zimmermann, 2016). PTV tem lenta eliminação e concentrações plasmáticas altas encontradas após 24 horas da administração, demonstrando alta biodisponibilidade (> 60%) (Kleymman *et al.*, 2002).

Portanto, esta característica em alcançar boas concentrações plasmáticas e cerebrais torna PTV um candidato ao tratamento de patógenos com tropismo para o SNC, como *T. gondii*. Há evidências de que o vírus HSV-1 pode ser responsável pelos depósitos anormais de proteína - placas amilóides e emaranhados neurofibrilares - considerados centrais para a patogênese do Alzheimer (Wozniak *et al.*, 2004) e PTV demonstrou reduzir estas moléculas em ensaios com modelo murino (Wozniak *et al.*, 2013). Quenelle e col (2018) também demonstraram que PTV obteve altas performances no tratamento de encefalite causada pelo *herpes-simplex*.

Neste trabalho foram analisados *in vitro*, o potencial inibidor da proliferação de PTV em taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH e em amastigotas de *T. cruzi* da cepa Y.

De forma a selecionar concentrações não tóxicas de PTV para os ensaios antiproliferativos com *T. gondii* e *T. cruzi*, foram realizados primeiramente os ensaios de citotoxicidade pelo método do MTS/PMS.

Neste trabalho foram testadas diferentes concentrações, 6,25 a 100 µg/mL, para a avaliação da viabilidade celular em células hospedeiras, no caso fibroblastos humanos NHDF. As células permaneceram em contato com o composto durante 7 dias de tratamento e não foi observado efeito citotóxico em nenhuma das concentrações testadas. Foi observado por Kleymman e col. (2002). que PTV foi 2500 e 3000 vezes mais seletivo para os vírus HSV-1 e HSV-2, respectivamente, do que em células Vero, o que demonstra sua segurança, o fármaco está em ensaios clínicos de fase II, onde se observa a redução da disseminação viral em pessoas saudáveis acometidas pelo vírus, o que representa até o momento a sua tolerabilidade (Wald *et al.*, 2014).

Nos ensaios proliferativos com *T. gondii*, taquizoítos foram permitidos à infecção por um período de 4 horas em placas com células confluentes, após este período, foram realizados tratamentos com duração de 24 horas e 48 horas, os valores de IC<sub>50</sub> 14,7 µg/mL ± 1,29 e 34,03 µg/mL ± 6,92, foram obtidos respectivamente, foi observada uma relação dose dependente em ambos os tratamentos. A inibição da proliferação dos parasitos foi cerca de 78% e 77%, na concentração 60 µg/mL, para o tratamento de 24 e 48 horas, respectivamente.

Foi possível analisar que em taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*, PTV teve uma maior ação inibitória nas primeiras 24 horas de tratamento, por ser uma cepa de alta taxa de proliferação intracelular e de re-invasão (Khan *et al.*, 2006), o período de 48 horas de

tratamento foi comprometido. Podemos sugerir o tratamento diário com PTV, assim a diminuição da proliferação em 48 horas pode ser esperada devido à maior concentração do fármaco no ambiente disponível para atuar nos parasitas intracelulares.

Em contrapartida, *T. cruzi* foi mais inibido após 48 horas de tratamento, onde os valores de  $IC_{50}$  obtidos foram de  $34,85 \mu\text{g/mL} \pm 1,40$  e  $22,40 \mu\text{g/mL} \pm 1,29$  e com inibição de 61 e 80% para 24 e 48 horas, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados comparado ao grupo controle, nos ensaios de 24 horas, mas obtivemos uma redução da proliferação de 65% no grupo tratado com  $60 \mu\text{g/mL}$  de PTV em relação ao grupo não tratado.

Nossos resultados sugerem que PTV é um fármaco promissor para o tratamento da Toxoplasmose e Doença de Chagas pelas altas taxas de inibição da proliferação destes dois protozoários. Sendo necessários mais estudos, como invasão, conversão à bradizoítos e ensaios *in vivo* para compreender melhor a sua atuação nestas duas cepas.

## 8. Conclusões

- Lopinavir foi capaz de interferir na invasão dos taquizoítos das cepas TgCTBr8 e TgCTBr5 de *T. gondii*, sendo a cepa TgCTBr8 mais suscetível ao pré-tratamento.
- Lopinavir embora tenha inibido *in vitro* a proliferação de taquizoítos cepa TgCTBr8, não foi capaz de atuar na infecção aguda *in vivo*, combinado com Ritonavir nas concentrações, forma de solubilização e de administração utilizadas.
- Os resultados *in vitro* não demonstraram interação entre Lopinavir e SDZ+PYR contra a cepa TgCTBr8, mas os resultados *in vivo* sugerem que a associação interferiu na proliferação dos taquizoítos e promovendo um menor número de cistos encontrados em fase aguda da infecção.
- A cepa TgCTBr8 tem maior capacidade cistogênica que a cepa TgCTBr5, tanto natural quanto induzida pelo fármaco Lopinavir.
- A cepa TgCTBr5 foi mais suscetível ao tratamento com SDZ+PYR *in vitro* do que a cepa TgCTBr8, ensaios de conversão de taquizoítos e bradizoítos são sugeridos para melhor interpretação destes resultados.
- Lopinavir em combinação com Ritonavir diminui moderadamente o número de cistos em camundongos infectados com a cepa TgCTBr5, demonstrando que estes compostos são promissores para tratamento da toxoplasmose em fase crônica.
- Pritelivir inibiu a proliferação de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* e amastigotas de *T. cruzi* da cepa Y, são compostos com potencial para o tratamento da Toxoplasmose e Doença de Chagas.

## 9. Referências

- Abbenante, G., & Fairlie, D. (2005). Protease Inhibitors in the Clinic. *Medicinal Chemistry*, 1(1), 71–104. doi:10.2174/1573406053402569
- Abiodun, O. O., Akinbo, J., & Ojurongbe, O. (2014). The effect of lopinavir/ritonavir on the antimalarial activity of artemether or artemether/lumefantrine in a mouse model of *Plasmodium berghei*. *Journal of Chemotherapy*, 27(1), 25-28.
- Abiodun, O. O., Gbimadee, N., & Gbotosho, G. O. (2016). Lopinavir/ritonavir enhanced the antimalarial activity of amodiaquine and artesunate in a mouse model of *Plasmodium berghei*. *Journal of Chemotherapy*, 28(6), 482-486.
- Abou-El-Naga, I. F., El Kerdany, E. D., Mady, R. F., Shalaby, T. I., & Zaytoun, E. M. (2017). The effect of lopinavir/ritonavir and lopinavir/ritonavir loaded PLGA nanoparticles on experimental toxoplasmosis. *Parasitology International*, 66(6), 735–747.
- Alfonso, Y., & Monzote, L. (2011). HIV protease inhibitors: effect on the opportunistic protozoan parasites. *The open medicinal chemistry journal*, 5, 40.
- Allegra, C. J., Boarman, D., Kovacs, J. A., Morrison, P., Beaver, J., Chabner, B. A., & Masur, H. (1990). Interaction of sulfonamide and sulfone compounds with *Toxoplasma gondii* dihydropteroate synthase. *The Journal of clinical investigation*, 85(2), 371-379.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*; 7(5).; e35671.
- Alves, C. F.; Vitor, R. W. A. (2005). Efficacy of atovaquone and sulfadiazine in the treatment of mice infected with *Toxoplasma gondii* strains isolated in Brazil. *Parasite*, 12.2: 171-177.
- Amato Neto, V. (2010). Origin of the " Y strain" of *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 52(3), 171-171.
- Andrews, N. W. (1994). From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian journal of medical and biological research= Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27(2), 471-475.
- Andrade L.O. & Andrews N.W. (2004) Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J Exp Med* 200: 1135–43.
- Andrews, K. T., Fairlie, D. P., Madala, P. K., Ray, J., Wyatt, D. M., Hilton, P. M., ... & McCarthy, J. S. (2006). Potencies of human immunodeficiency virus protease inhibitors in vitro against *Plasmodium falciparum* and in vivo against murine malaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(2), 639-648.
- Angheben, A., Boix, L., Buonfrate, D., Gobbi, F., Bisoffi, Z., Pupella, S., ... & Aprili, G. (2015). Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood transfusion*, 13(4), 540.
- Appleford, Peter J., and Judith E. Smith. (1997). *Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains. *Acta tropica* 65.2: 97-104.

- Araujo, F., Slifer, T., & Kim, S. (1997). Chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not prevent acute disease or colonization of the brain with tissue cysts following reinfection with different strains of the parasite. *The Journal of parasitology*, 83(3), 521-522.
- de Araujo Jorge, T. C., & De Souza, W. (1984). Effect of carbohydrates, periodate and enzymes in the process of endocytosis of *Trypanosoma cruzi* by macrophages. *Acta tropica*, 41(1), 17-28.
- Arling, T. A., Yolken, R. H., Lapidus, M., Langenberg, P., Dickerson, F. B., Zimmerman, S. A., ... & Postolache, T. T. (2009). *Toxoplasma gondii* antibody titers and history of suicide attempts in patients with recurrent mood disorders. *The Journal of nervous and mental disease*, 197(12), 905-908.
- Ashburn, T. T., & Thor, K. B. (2004). Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 3(8), 673-683.
- Attias, M. et al.. Atlas Didático: Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Rio de Janeiro: UFRJ, 2019.
- Bahia-Oliveira, L. M. G., Jones, J. L., Azevedo-Silva, J., Alves, C. C., Oréfice, F., & Addiss, D. G. (2003). Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 9(1), 55.
- Barbosa, Joana Lobato. Avaliação da infecção experimental de neurônios e células da glia do gânglio cervical superior por uma cepa brasileira atípica de *Toxoplasma gondii*. 2015. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Patologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- Barrias, E. S., Carvalho, T. M. U., & De Souza, W. (2013). *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Frontiers in immunology*, 4, 186.
- Bern, C.. Chagas' Disease. (2015). *New England Journal of Medicine*. 373(5), 456466.
- Beverley, J. K. A., & Fry, B. A. (1957). Sulphadimidine, pyrimethamine and dapsone in the treatment of toxoplasmosis in mice. *British journal of pharmacology and chemotherapy*, 12(2), 189-193.
- Beverley, J. K. A., Freeman, A. P., Henry, L., Whelan, J. P. F. & Baker, L. (1973). Prevention of pathological changes in experimental congenital toxoplasmosis infection. *Lyon Medicale* 17,491-6.
- Birkmann, A., & Zimmermann, H. (2016). HSV antivirals—current and future treatment options. *Current opinion in virology*, 18, 9-13.
- Bocchi, E. A., Bestetti, R. B., Scanavacca, M. I., Cunha Neto, E., & Issa, V. S. (2017). Chronic Chagas heart disease management: from etiology to cardiomyopathy treatment. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(12), 1510-1524.
- Brasil. Ministério Da Saúde, Secretaria de vigilância em saúde. Doença de Chagas: situação epidemiológica. 2021. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/abril/14/boletim\\_especial\\_chagas\\_14abr21\\_b.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/abril/14/boletim_especial_chagas_14abr21_b.pdf). Acesso em: 04/06/2021.

- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 11, 127-152.
- Brooks RG, Remington JS. Transplant-related infections. (1986). In: Bennett JV, Brachman PS, eds. *Hospital infections*, 2nd edn. Boston: Little, Brown and Co: 581–618.
- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M.. *Leishmaniasis*. (2018). *The Lancet*.
- Byakika-Kibwika, P., Lamorde, M., Okaba-Kayom, V., Mayanja-Kizza, H., Katabira, E., Hanpithakpong, W., ... & Merry, C. (2012). Lopinavir/ritonavir significantly influences pharmacokinetic exposure of artemether/lumefantrine in HIV-infected Ugandan adults. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(5), 1217-1223.
- Cardo, L. J.. *Leishmania: risk to the blood supply*. *Transfusion*, (2006); 46(9), 641–1645.
- Carellos, E. V. M., Caiaffa, W. T., Andrade, G. M. Q., Abreu, M. N. S., & Januário, J. N. (2014). Congenital toxoplasmosis in the state of Minas Gerais, Brazil: a neglected infectious disease?. *Epidemiology & Infection*, 142(3), 644-655.
- Carlier, Y., Torrico, F., Sosa-Estani, S., Russomando, G., Luquetti, A., Freilij, H., & Vinas, P. A. (2011). Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(10), e1250.
- Carneiro, A. C. A. V., Andrade, G. M., Costa, J. G. L., Pinheiro, B. V., Vasconcelos-Santos, D. V., Ferreira, A. M., ... & Vitor, R. W. A. (2013). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. *Journal of clinical microbiology*, 51(3), 901-907.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), 159-218.
- Chandwani, A., & Shuter, J. (2008). Lopinavir/ritonavir in the treatment of HIV-1 infection: a review. *Therapeutics and clinical risk management*, 4(5), 1023.
- Charron, A., Sibley, L. (2002). Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*, v.115 p.3049-3059.
- Córdova, E., Maiolo, E., Corti, M., & Orduna, T. (2010). Neurological manifestations of Chagas' disease. *Neurological research*, 32(3), 238-244.
- Couvreur, J., Desmots, G., & Thulliez, P. (1988). Prophylaxis of congenital toxoplasmosis. Effects of spiramycin on placental infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22(Supplement\_B), 193-200.
- Cvetkovic, R.S., Goa, K.L. Lopinavir/ritonavir: a review of its use in the management of HIV infection. (2003). *Drugs* 63 (8) 769–802.
- Crespillo-Andújar, C., Chamorro-Tojeiro, S., Norman, F., Monge-Maillo, B., López-Vélez, R., & Pérez-Molina, J. A. (2018). Toxicity of nifurtimox as second-line treatment after benznidazole intolerance in patients with chronic Chagas disease: when available options fail. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(12), 1344.

Dardé, M. L. (2008). *Toxoplasma gondii*, “new” genotypes and virulence. *Parasite*, 15(3), 366-371.

De Diego, J. L., Katz, J. M., Marshall, P., Gutiérrez, B., Manning, J. E., Nussenzweig, V., & González, J. (2001). The Ubiquitin-Proteasome Pathway Plays an Essential Role in Proteolysis during *Trypanosoma cruzi* Remodeling†. *Biochemistry*, 40(4), 1053-1062.

Derouin, F., & Santillana-Hayat, M. (2000). Anti-*Toxoplasma* activities of antiretroviral drugs and interactions with pyrimethamine and sulfadiazine in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(9), 2575-2577.

Dogga, S. K., Mukherjee, B., Jacot, D., Kockmann, T., Molino, L., Hammoudi, P. M., ... & Soldati-Favre, D. (2017). A druggable secretory protein maturase of *Toxoplasma* essential for invasion and egress. *Elife*, 6, e27480.

Dorlo, T. P., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., & de Vries, P. J. (2012). Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2576-2597.

Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical microbiology reviews*, 11(2), 267-299.

Dubey, J. P., Lago, E. G., Gennari, S. M., Su, C., & Jones, J. L. (2012). Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*, 139(11), 1375.

Dunay, I. R., Gajurel, K., Dhakal, R., Liesenfeld, O., & Montoya, J. G. (2018). Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), e00057-17.

Echeverria, L. E., & Morillo, C. A. (2019). American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics*, 33(1), 119-134.

Eidell, K. P., Burke, T., & Gubbels, M. J. (2010). Development of a screen to dissect *Toxoplasma gondii* egress. *Molecular and biochemical parasitology*, 171(2), 97-103.

Elbez-Rubinstein, A., Ajzenberg, D., Dardé, M. L., Cohen, R., Dumètre, A., Yera, H., ... & Thulliez, P. (2009). Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *The Journal of infectious diseases*, 199(2), 280-285.

Eyles, D. E., & Coleman, N. (1954). Notes on the Treatment of Acute Experimental Toxoplasmosis of the Mouse with Chlortetracycline and Tetracycline. *Antibiotics & Chemotherapy*, 4(9), 988-91.

Eyles, D. E., & Coleman, N. (1955). An evaluation of the curative effects of pyrimethamine and sulfadiazine, alone and in combination, on experimental mouse toxoplasmosis. *Antibiotics & Chemotherapy*, 5(10), 529-39.

- Fernandes, M. C., Flannery, A. R., Andrews, N., & Mortara, R. A. (2013). Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. *Cellular microbiology*, 15(6), 977-991.
- Fernandes, M. C., Flannery, A. R., Andrews, N., & Mortara, R. A. (2013). Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. *Cellular microbiology*, 15(6), 977-991.
- Ferreira, A. M., Vitor, R. W. A., Gazzinelli, R. T., & Melo, M. N. (2006). Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, 6(1), 22-31.
- Ferreira, B. L., Ferreira, É. R., Bonfim-Melo, A., Mortara, R. A., & Bahia, D. (2019). *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes selectively trigger the PI3K/Akt and Erk pathways during HeLa cell invasion. *Microbes and infection*, 21(10), 485-489.
- Ferreira, M. D. F. F., Barbosa, H. S., Groß, U., & Lüder, C. G. (2008). Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Molecular Biosystems*, 4(8), 824-834.
- Figueiro-Filho, E. A., Duarte, G., El-Beitune, P., Quintana, S. M., & Maia, T. L. (2004). Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 12(1), 31-40.
- Flegr, J. (2013). How and why *Toxoplasma* makes us crazy. *Trends in parasitology*, 29(4), 156-163.
- Flexner, C. (1998). HIV-Protease Inhibitors. *New England Journal of Medicine*, 338(18), 1281-1293.
- Fortier, B., Aissi, E., Ajana, F., Dieusart, P., & Denis, P. (1991). Spontaneous abortion and reinfection by *Toxoplasma gondii*. *Lancet (British edition)*, 338(8764).
- Garin JP, Eyles DE. (1958). Spiramycin therapy of experimental toxoplasmosis in mice. *Presse Med* 66:957-958.
- Garweg, J. G., & Candolfi, E. (2009). Immunopathology in ocular toxoplasmosis: facts and clues. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2), 211-220.
- Gavinet, M. F., Robert, F., Firtion, G., Delouvrier, E., Hennequin, C., Maurin, J. R., ... & Dupouy-Camet, J. (1997). Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(5), 1276-1277.
- Gilbert, R. E., Freeman, K., Lago, E. G., Bahia-Oliveira, L. M., Tan, H. K., Wallon, M., ... & European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (EMSCOT). (2008). Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis*, 2(8), e277.
- Gilbert R. 2009. Treatment for congenital toxoplasmosis: finding out what works. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104(2): 305-311.
- Glasner, P. D., Silveira, C., Kruszon-Moran, D., Martins, M. C., Burnier Jr, M., Silveira, S., ... & Belfort Jr, R. (1992). An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *American journal of ophthalmology*, 114(2), 136-144.

- Gross, U., & Pohl, F. (1996). Influence of antimicrobial agents on replication and stage conversion of *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma gondii*, 235-245.
- Halonen SK., Weiss LM. (2013). Toxoplasmosis. *Handb Clin Neurol* . 114: 125-45.
- Hammoudi, P. M., Jacot, D., Mueller, C., Di Cristina, M., Dogga, S. K., Marq, J. B., ... & Soldati-Favre, D. (2015). Fundamental roles of the Golgi-associated *Toxoplasma* aspartyl protease, ASP5, at the host-parasite interface. *PLoS Pathog*, 11(10), e1005211.
- Hennequin, C., Dureau, P., N'guyen, L., Thulliez, P., Gagelin, B., & Dufier, J. L. (1997). Congenital toxoplasmosis acquired from an immune woman. *The Pediatric infectious disease journal*, 16(1), 75-77.
- Hobbs, C. V., Voza, T., Coppi, A., Kirmse, B., Marsh, K., Borkowsky, W., & Sinnis, P. (2009). HIV protease inhibitors inhibit the development of preerythrocytic-stage plasmodium parasites. *The Journal of infectious diseases*, 199(1), 134-141.
- Holland GN.(2003). Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. *Am J Ophthalmol*; 136: 973-988.
- Horta, M. F., Andrade, L. O., Martins-Duarte, É. S., & Castro-Gomes, T. (2020). Cell invasion by intracellular parasites—the many roads to infection. *Journal of cell science*, 133(4).
- Hotez, P. J., Alvarado, M., Basáñez, M. G., Bolliger, I., Bourne, R., Boussinesq, M., ... & Naghavi, M. (2014). The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(7), e2865.
- Howe, D. K., & Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *Journal of infectious diseases*, 172(6), 1561-1566.
- Israelski, D. M., Tom, C., & Remington, J. S. (1989). Zidovudine antagonizes the action of pyrimethamine in experimental infection with *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 33(1), 30-34.
- Israelski, D. M. (1993). Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host. *Curr Clin Topics in infectious diseases*, 13, 322-356.
- Jones, L. A.; Alexander, j.; Roberts, C. W. (2006). Ocular toxoplasmosis: in the storm of the eye. *Parasite immunology*, 28.12: 635-642.
- Kevric, I., Cappel, M. A., & Keeling, J. H. (2015). New World and Old World *Leishmania* Infections. *Dermatologic Clinics*, 33(3), 579–593.
- Khan, A., Jordan, C., Muccioli, C., Vallochi, A. L., Rizzo, L. V., Belfort Jr, R., ... & Sibley, L. D. (2006). Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 12(6), 942.
- Khan, K., & Khan, W. (2018). Congenital toxoplasmosis: an overview of the neurological and ocular manifestations. *Parasitology International*, 67(6), 715-721.
- Kleymann, G., Fischer, R., Betz, U. A. K., Hendrix, M., Bender, W., Schneider, U., ... Rübsamen-Waigmann, H. (2002). New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease. *Nature Medicine*, 8(4), 392–398.

- Kodjikian, L., Hoigne, I., Adam, O., Jacquier, P., Aebi-Ochsner, C., Aebi, C., & Garweg, J. G. (2004). Vertical transmission of toxoplasmosis from a chronically infected immunocompetent woman. *The Pediatric infectious disease journal*, 23(3), 272-274.
- Konstantinovic, N., Guegan, H., Stājner, T., Belaz, S., & Robert-Gangneux, F. (2019). Treatment of toxoplasmosis: current options and future perspectives. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00036.
- Kortagere, S. (2012). Screening for small molecule inhibitors of *Toxoplasma gondii*. *Expert Opinion on Drug Discovery*; 7(12), 1193–1206.
- Krivogorsky, B., Grundt, P., Yolken, R., & Jones-Brando, L. (2008). Inhibition of *Toxoplasma gondii* by indirubin and tryptanthrin analogs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(12), 4466-4469.
- Kumar, G. N., Jayanti, V. K., Johnson, M. K., Uchic, J., Thomas, S., Lee, R. D., ... Roberts, S. A. (2004). Metabolism and Disposition of the HIV-1 Protease Inhibitor Lopinavir (ABT-378) Given in Combination with Ritonavir in Rats, Dogs, and Humans. *Pharmaceutical Research*, 21(9), 1622–1630.
- Lara CM, Lagos AAR, Santos DVV. Toxoplasmose ocular. In: Conselho Brasileiro de Oftalmologia; Paula JS, Rocha J, organizadores. PRO-OFTALMO Programa de Atualização em Oftalmologia: Ciclo 1. Porto Alegre: Artmed Panamericana; 2017. p. 13–53. (Sistema de Educação Continuada a Distância, v. 1).
- Lebas, F., Ducrocq, S., Mucignat, V., Paris, L., Megier, P., Baudon, J. J., & Gold, F. (2004). Congenital toxoplasmosis: a new case of infection during pregnancy in an previously immunized and immunocompetent woman. *Archives de pediatrie: organe officiel de la Société française de pédiatrie*, 11(8), 926-928.
- Lotfi Shahreza, M., Ghadiri, N., Mousavi, S. R., Varshosaz, J., & Green, J. R. (2018). A review of network-based approaches to drug repositioning. *Briefings in bioinformatics*, 19(5), 878-892.
- Luft BJ, Remington JS. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Disease Society of America*; 15 (2): 211-222.
- Mahdi, M., Mótyán, J. A., Szojka, Z. I., Golda, M., Miczi, M., & Tózsér, J. (2020). Analysis of the efficacy of HIV protease inhibitors against SARS-CoV-2' s main protease. *Virology journal*, 17(1), 1-8.
- Martins-Melo, F. R., Ramos Jr, A. N., Alencar, C. H., & Heukelbach, J. (2014). Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Acta tropica*, 130, 167-174.
- Martynowicz, J., Augusto, L., Wek, R. C., Boehm, S. L., & Sullivan Jr, W. J. (2019). Guanabenz reverses a key behavioral change caused by latent toxoplasmosis in mice by reducing neuroinflammation. *MBio*, 10(2), e00381-19.
- Masoudi-Sobhazadeh, Y., Omid, Y., Amanlou, M., & Masoudi-Nejad, A. (2019). Drug databases and their contributions to drug repurposing. *Genomics*, 112(2), 1087-1095.
- McGwire, B. S., & Satoskar, A. R. (2013). Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM*; 107(1), 7–14.

- Meneceur, P., Bouldouyre, M. A., Aubert, D., Villena, I., Menotti, J., Sauvage, V., ... & Derouin, F. (2008). In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), 1269-1277.
- Mohanty, S., Shah, I., & Bhatnagar, S. (2012). Neonatal hepatitis with toxoplasmosis. *Journal of clinical neonatology*, 1(2), 96.
- Molina, I., Gómez i Prat, J., Salvador, F., Treviño, B., Sulleiro, E., Serre, N., ... & Pahissa, A. (2014). Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*, 370(20), 1899-1908.
- Montazeri, M., Sharif, M., Sarvi, S., Mehrzadi, S., Ahmadpour, E., & Daryani, A. (2017). A systematic review of in vitro and in vivo activities of anti-*Toxoplasma* drugs and compounds (2006–2016). *Frontiers in microbiology*, 8, 25.
- Montoya, J. G., Giraldo, L. F., Efron, B., Stinson, E. B., Gamberg, P., Hunt, S., ... & Remington, J. S. (2001). Infectious complications among 620 consecutive heart transplant patients at Stanford University Medical Center. *Clinical infectious diseases*, 33(5), 629-640.
- Montoya JG, Remington JS. (2008). Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis*; 47:554–566.
- Montoya, J., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet*; 363(9425), 1965–1976.
- Monzote, L., Rodríguez, M., Alfonso, Y., & Cox, R. (2013). Antiretroviral activity of protease inhibitors against *Toxoplasma gondii*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 55(1), 65-67.
- Morillo CA. (2013). Infection with *Trypanosoma cruzi* and progression to cardiomyopathy: what is the evidence and is the tide finally turning? *Circulation*; 127(10): 1095–7.
- Morrisette, N. S., & Sibley, L. D. (2002). Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(1), 21-38.
- Müller Kratz, J., Garcia Bournissen, F., Forsyth, C. J., & Sosa-Estani, S. (2018). Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 11(10), 943-957.
- Müller Kratz, J. (2019). Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. *Acta tropica*, 198, 105107.
- Neto, E. C., Amorim, F., & Lago, E. G. (2010). Estimation of the regional distribution of congenital toxoplasmosis in Brazil from the results of neonatal screening. *Scientia Medica*, 20(1), 64-70.
- Nii-Trebi, N. I. (2017). Emerging and neglected infectious diseases: insights, advances, and challenges. *BioMed research international*, 2017.
- Odds, F.C., 2003. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 1.
- Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *Journal of Infection*, 69, S10–S18.

- Pappas, G., Roussos, N., & Falagas, M. E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International journal for parasitology*, 39(12), 1385-1394.
- Paredes-Santos, T. C., Martins-Duarte, E. S., Vitor, R. W. A., De Souza, W., Attias, M., & Vommaro, R. C. (2013). Spontaneous cystogenesis in vitro of a Brazilian strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology international*, 62(2), 181-188.
- Parikh, S., Gut, J., Istvan, E., Goldberg, D. E., Havlir, D. V., & Rosenthal, P. J. (2005). Antimalarial activity of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(7), 2983-2985.
- Pena H.F.J., Gennari S.M, Dubey J.P, Su C. 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 38:561–569.
- Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391(10115), 82–94.
- Pinazo, M. J., Muñoz, J., Posada, E., López-Chejade, P., Gállego, M., Ayala, E., ... & Gascon, J. (2010). Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(11), 4896-4899.
- Pinheiro, Breno Veloso. Toxoplasmose congênita humana: Caracterização de cepas de *Toxoplasma gondii* em linhagens isogênicas de camundongos. 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Parasitologia, Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/BUOS-9KXJF4>. Acesso em: 07 abr. 2021.
- Polonais, V., Shea, M., & Soldati-Favre, D. (2011). *Toxoplasma gondii* aspartic protease 1 is not essential in tachyzoites. *Experimental parasitology*, 128(4), 454-459.
- Pozio, E., & Morales, M. A. G. (2005). The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. *Trends in parasitology*, 21(2), 58-63.
- Quenelle, D. C., Birkmann, A., Goldner, T., Pfaff, T., Zimmermann, H., Bonsmann, S., ... & Prichard, M. N. (2018). Efficacy of pritelivir and acyclovir in the treatment of herpes simplex virus infections in a mouse model of herpes simplex encephalitis. *Antiviral research*, 149, 1-6.
- Radke, J. R., Striepen, B., Guerini, M. N., Jerome, M. E., Roos, D. S., & White, M. W. (2001). Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and biochemical parasitology*, 115(2), 165-175.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. (2010). Chagas disease. *Lancet*; 375(9723): 1388–402.
- Rebello, K. M., Andrade-Neto, V. V., Zuma, A. A., Motta, M. C. M., Gomes, C. R. B., de Souza, M. V. N., ... & d'Avila-Levy, C. M. (2018). Lopinavir, an HIV-1 peptidase inhibitor, induces alteration on the lipid metabolism of *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitology*, 145(10), 1304-1310.
- Ribeiro, M., Nitz, N., Santana, C., Moraes, A., Hagström, L., Andrade, R., ... & Hecht, M. (2016). Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Experimental parasitology*, 162, 1-6.

- Rios, A., Ribeiro, M., Sousa, A., Pimentel, F., Hagström, L., Andrade, R., ... & Hecht, M. M. (2018). Can sexual transmission support the enzootic cycle of *Trypanosoma cruzi*?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(1), 3-8.
- Roberts, C. W., Walker, W., & Alexander, J. (2001). Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clinical microbiology reviews*, 14(3), 476-488.
- Rodriguez, A., Samoff, E., Rioult, M. G., Chung, A., & Andrews, N. W. (1996). Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *The Journal of cell biology*, 134(2), 349-362.
- Sabin, A. B. (1941). Toxoplasmic encephalitis in children. *Journal of the American Medical Association*, 116(9), 801-807.
- Saeij, J. P., Boyle, J. P., & Boothroyd, J. C. (2005). Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends in parasitology*, 21(10), 476-481.
- Salassa, B. N., & Romano, P. S. (2019). Autophagy: A necessary process during the *Trypanosoma cruzi* life-cycle. *Virulence*, 10(1), 460-469.
- Sangenito, L. S., d'Avila-Levy, C. M., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. (2016). Nelfinavir and lopinavir impair *Trypanosoma cruzi* trypomastigote infection in mammalian host cells and show anti-amastigote activity. *International journal of antimicrobial agents*, 48(6), 703-711.
- Sangenito, L. S., Menna-Barreto, R. F., d'Avila-Levy, C. M., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. (2019). Repositioning of HIV aspartyl peptidase inhibitors for combating the neglected human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Current medicinal chemistry*, 26(36), 6590-6613.
- Savoia, D., Allice, T., & Tovo, P.-A. (2005). Antileishmanial activity of HIV protease inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(1), 92-94.
- Schwab, J. C., Beckers, C. J., & Joiner, K. A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(2), 509-513.
- Shwab, E. K., Zhu, X. Q., Majumdar, D., Pena, H. F., Gennari, S. M., Dubey, J. P., & Su, C. (2014). Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology*, 141(4), 453-461.
- Silva, L. A., Reis-Cunha, J. L., Bartholomeu, D. C., & Vitor, R. W. A. (2017). Genetic polymorphisms and phenotypic profiles of sulfadiazine-resistant and sensitive *Toxoplasma gondii* isolates obtained from newborns with congenital toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil. *PloS one*, 12(1), e0170689.
- Silva, L. A., Fernandes, M. D., Machado, A. S., Reis-Cunha, J. L., Bartholomeu, D. C., & Vitor, R. W. A. (2019). Efficacy of sulfadiazine and pyrimetamine for treatment of experimental toxoplasmosis with strains obtained from human cases of congenital disease in Brazil. *Experimental parasitology*, 202, 7-14.
- Silveira, C., Belfort, R., Burnier, M., & Nussenblatt, R. (1988). Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. *American journal of ophthalmology*, 106(15), 362-364.


- Sinha, S., Ali, M., Baboota, S., Ahuja, A., Kumar, A., & Ali, J. (2010). Solid dispersion as an approach for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drug ritonavir. *Aaps Pharmscitech*, 11(2), 518-527.
- Skinner-Adams, T. S., McCarthy, J. S., Gardiner, D. L., Hilton, P. M., & Andrews, K. T. (2004). Antiretrovirals as antimalarial agents. *The Journal of infectious diseases*, 190(11), 1998-2000.
- Sonoiki, E., Nsanzabana, C., Legac, J., Sindhe, K. M., DeRisi, J., & Rosenthal, P. J. (2017). Altered *Plasmodium falciparum* sensitivity to the antiretroviral protease inhibitor lopinavir associated with polymorphisms in pfmdr1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(1), e01949-16.
- de Souza W. (1974). The fine structure of the conoid of *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop. São Paulo*; 16:32-8.
- de Souza, W., Martins-Duarte, E. S., Lemgruber, L., Attias, M., & Vommaro, R. C. (2010). Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* [Abstract in English]. *Scientia Medica*, 20(1), 131-143.
- De Souza, W., De Carvalho, T. M. U., & Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *International journal of cell biology*, 2010.
- Sullivan Jr, W. J., & Jeffers, V. (2012). Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS microbiology reviews*, 36(3), 717-733.
- Staquicini, D. I., Martins, R. M., Macedo, S., Sasso, G. R., Atayde, V. D., Juliano, M. A., & Yoshida, N. (2010). Role of GP82 in the selective binding to gastric mucin during oral infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(3), e613.
- Stella, J. H. (2004). Rastreamento pré-natal para toxoplasmose na rede básica de saúde em Campinas—prevalência dos diferentes perfis sorológicos e comparação da rotina vigente com uma nova proposta [Dissertação de Mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas.
- Su, C., Zhang, X., & Dubey, J. P. (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *International journal for parasitology*, 36(7), 841-848.
- Tallarida, R. J. (2006). An overview of drug combination analysis with isobolograms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(1), 1-7.
- Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal for parasitology*, 30(12-13), 1217-1258.
- SYROCOT (Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis) study group. (2007). Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *The Lancet*, 369(9556), 115-122.
- Trouiller, P., Olliaro, P., Torreele, E., Orbinski, J., Laing, R., & Ford, N. (2017). Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Global Health*, 267-273.

- Vallochi, A. L., Muccioli, C., Martins, M. C., Silveira, C., Belfort Jr, R., & Rizzo, L. V. (2005). The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. *American journal of ophthalmology*, 139(2), 350-351.
- Vasconcelos-Santos, D. V., Azevedo, D. O. M., Campos, W. R., Oréface, F., Queiroz-Andrade, G. M., Carellos, É. V. M., ... & Group, U. C. T. B. (2009). Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. *Ophthalmology*, 116(11), 2199-2205.
- Vidal, J. E., & Oliveira, A. C. (2013). AIDS-related cerebral toxoplasmosis in São Paulo State, Brazil: marked improvements in the highly active antiretroviral therapy-era but the challenges continue. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 17(3), 379-380.
- Villalta, F., Scharfstein, J., Ashton, A. W., Tyler, K. M., Guan, F., Mukherjee, S., et al. (2009). Perspectives on the *Trypanosoma cruzi*-host cell receptor interactions. *Parasitology research*, 104(6), 1251-1260.
- Vogel, N., Kirisits, M., Michael, E., Bach, H., Hostetter, M., Boyer, K., ... & McLeod, R. (1996). Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. *Clinical infectious diseases*, 23(5), 1055-1060.
- Wald, A., Corey, L., Timmler, B., Magaret, A., Warren, T., Tyring, S., ... & Birkmann, A. (2014). Pritelivir inibidor de Helicase-primase para infecção por HSV-2. *New England Journal of Medicine*, 370 (3), 201-210.
- Waller, R. F., Ralph, S. A., Reed, M. B., Su, V., Douglas, J. D., Minnikin, D. E., ... & McFadden, G. I. (2003). A type II pathway for fatty acid biosynthesis presents drug targets in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 297-301.
- Weiss, M. G. (2008). Stigma and the social burden of neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis*, 2(5), e237.
- Weiss, L. M., & Dubey, J. P. (2009). Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *International journal for parasitology*, 39(8), 895-901.
- WHO. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). *Epidemiology*. 2009. Disponível em: <https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>. Acesso em: 06/01/2020.
- Wozniak, M. A., Shipley, S. J., Combrinck, M., Wilcock, G. K., & Itzhaki, R. F. (2004). Productive herpes simplex virus in brain of elderly normal subjects and Alzheimer's disease patients. *Journal of medical virology*, 75(2), 300-306.
- Wozniak, MA, Frost, AL, & Itzhaki, RF (2013). The helicase-primase inhibitor BAY 57-1293 reduces herpes simplex virus type 1-induced Alzheimer's disease-related molecules. *Antiviral Research*, 99 (3), 401-404.
- Yoshida, N., Tyler, K. M., & Llewellyn, M. S. (2011). Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends in parasitology*, 27(10), 459-466.
- Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., ... & Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature:

rationale, epidemiological relevance and research applications. Infection, genetics and evolution, 12(2), 240-253.

## 10. Anexos

### Protocolo CEUA



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

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

**Protocolo CEUA:** 32/2019  
**Título do projeto:** Validação da atividade in vivo de fármacos e novos compostos para o tratamento da Toxoplasmose aguda e crônica  
**Finalidade:** Pesquisa  
**Pesquisador responsável:** Erica dos Santos Martins Duarte  
**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas  
**Departamento:** Departamento de Parasitologia

**Situação atual:** Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião do dia 13/05/2019. Validade: 13/05/2019 à 12/05/2024  
Belo Horizonte, 13/05/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

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

## Cadastro Sisgen



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

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

**Certidão**

**Cadastro nº A736DE6**

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

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

**Espécie**

**Toxoplasma gondii**  
**Toxoplasma gondii**  
**Toxoplasma gondii**

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

**Equipe**

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

**Resultados Obtidos**

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

Identificação do meio onde foi divulgado: **Artigos científicos: doi10.1128/JCM.02502-12**  
 Identificação do meio onde foi divulgado: **Tese defendida por Ana Carolina de Aguiar Vas**  
 Identificação do meio onde foi divulgado: **-Dissertação defendida por Breno Veloso Pinhe**  
 Identificação do meio onde foi divulgado: **Artigos científicos: doi10.1016/j.exppara.2015.0**

Data do Cadastro: **08/10/2020 14:54:03**  
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 11:02 de 03/06/2021.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **SISGEN**