



PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOMEDICINA TRANSLACIONAL
MESTRADO ACADÊMICO E DOUTORADO



Defesa de mestrado

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-*Toxoplasma gondii* DE
COMPOSTOS METALOCOMPLEXOS N0414 e N5814
NÃO COORDENADOS A SULFADIAZINA**

Ary Guedes Porto Duarte

CENTRO UNIVERSITÁRIO ESTADUAL DA ZONA OESTE

RIO DE JANEIRO

2017

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-Toxoplasma gondii DE COMPOSTOS METALOCOMPLEXOS N0414 E N5814 NÃO COORDENADOS A SULFADIAZINA

Ary Guedes Porto Duarte

Projeto de dissertação apresentado ao programa de pós-
graduação em biomedicina translacional - BIOTRANS como parte
das exigências para a defesa do mestrado

Orientadores: Dr. Sérgio Henrique Seabra

Dr. Fabio da Silva Azevedo Fortes

Rio de Janeiro

2017

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-Toxoplasma gondii DE COMPOSTOS METALOCOMPLEXOS N0414 E N5814 NÃO COORDENADOS A SULFADIAZINA

Ary Guedes Porto Duarte

Dissertação aprovada em: 11/12/2017

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sergio Henrique Seabra (Doutor, UEZO) – Orientador

Prof. Dr. Paulo Redner (Doutor, FIOCRUZ)

Prof. Dr. Júlio Vianna Barbosa (Doutor, FIOCRUZ)

Prof. Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho (Doutor, INMETRO)

Prof. Dra. Eidy Santos (Doutora, UEZO)

Rio de Janeiro

2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por todas coisas, a Ele todo meu agradecimento pelas coisas que tem feito em minha vida.

Agradeço a toda minha família pelo incentivo e força, porém, dois agradecimentos precisam ser especiais: a minha mãe, Ivania, por todo seu amor e apoio incondicional para me ver no final da realização deste sonho e ao meu avô, Arivaldo, por todos os momentos onde sempre pude parar para ouvir seus sábios conselhos.

Agradeço também aqueles que não estão mais no final da realização deste sonho, mas que com certeza me ajudaram muito no início desta caminhada. Obrigado Michelle, por tudo, e obrigado por você, Anjinho, pelo o que você é em minha vida, te amo!

Meus mais sinceros agradecimentos ao meu orientador Sérgio Seabra, que sempre acreditou em mim, mesmo quando nem eu mesmo acreditava. Obrigado pelo seu otimismo que me fazia sempre voltar a acreditar que era possível.

Agradeço a todos os amigos que pude fazer no laboratório, em especial Pedro (encantado), que foi amigo nas mais diversas horas, e à professora Jéssica, por todos os conselhos, incentivos e por ser minha companheira de café.

Agradeço também a todos os professores do BIOTRANS, aos órgãos que tornaram possível o avanço desse projeto – UNIGRANRIO, UEZO, BIOTRANS, INMETRO e UENF.

Por fim, um agradecimento especial para alguém que tem se tornado cada vez mais presente na minha vida de várias formas, a você Marina, meu muito obrigado por tudo!

*“Nenhum sucesso na vida compensa
o fracasso no lar”
(David O. McKay)*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01- Formas infectantes do *Toxoplasma gondii* e seu ciclo de vida

Figura 02- Diferenças estruturais dos taquizoítos e bradizoítos

Figura 03- Dados epidemiológicos e comparativos

Figura 04A e 04B- Diferença na fórmula estrutural dos compostos N5814 e N0414

Figura 05- Gráfico representativo de diferentes concentrações do composto N0414 em 24h

Figura 06- Gráfico representativo de diferentes concentrações do composto N0414 em 48h

Figura 07- Gráfico representativo de diferentes concentrações do composto N5814 em 24h

Figura 08- Gráfico representativo de diferentes concentrações do composto N5814 em 48h

Figura 09- Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* sem tratamento no período de 24h pós infecção

Figura 10- Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* sem tratamento no período de 48h pós infecção

Figura 11- Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* tratada na concentração de 8 μ M no período de 24h pós infecção

Figura 12- Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* tratada na concentração de 8 μ M no período de 48h pós infecção

Figura 13- Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* tratada na concentração de 10 μ M no período de 24h pós infecção

Figura 14- Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* tratada na concentração de 10 μ M no período de 48h pós infecção

Figura 15- Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* tratada na concentração de 50 μ M no período de 24h pós infecção.

Figura 16- Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* tratada na concentração de 50 μ M no período de 24h pós infecção

Figura 17- Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* sem tratamento no período de 48h

Figura 18- Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 24 horas: grânulos de amilopectina

Figura 19- Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 24 horas: presença de grânulos

Figura 20- Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 24 horas: grânulos de amilopectina e necrose

Figura 21- Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 48 horas: parasitos necrosados

Figura 22- Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 48 horas: parasito necrosado

Figura 23- Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 48 horas: multiparasitas necrosados

Figura 24- Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N5814 depois de 48 horas: morte por necrose

Figura 25- Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 24 horas: divisão alterada

Figura 26- Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 24 horas: divisão alterada

Figura 27- Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 48 horas: falha na endodiogenia

Figura 28- Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N5814 depois de 24 horas: extração citoplasmática do parasito

Figura 29- Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N5814 depois de 48 horas: estrutura parasitária alterada

Figura 30- Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 24 horas: provável desorganização do Retículo Endoplasmático

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês Acquired Immunodeficiency Syndrome

CO₂ – Monóxido de Carbono

DMEM – do inglês Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

HmtpO – {5-metil-1,2,4-triazol [1,5-a] pirimidina-7 (4H)-um}

HPCINOL – [1-(bis-piridina-2-ylmetil-amino)-3-cloropropano-2-ol]

IC₅₀ – concentração inibitória do crescimento celular em 50%

I.S – Índice de Seletividade

LLC-MK2 – Células epiteliais de rim de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*)

ml – Mililitro

PBS – Solução Salina Tamponada de Fosfato

pH – Potencial Hidrogeniônico

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

RPMI – Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute

SFB – Soro Fetal Bovino

U/mg – Unidade por miligrama

UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense

µg – Micrograma

µm – Micrometro

µM – Micromolar

SUMÁRIO

Resumo	XI
Abstract.....	XII
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	16
1.2. Dados Epidemiológicos	21
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. OBJETIVO GERAL.....	22
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. MANUTENÇÃO DOS PARASITAS	23
3.2. CULTIVO E MANUTENÇÃO DA CÉLULA-HOSPEDEIRA.....	23
3.3. COMPOSTOS.....	23
3.4. CITOTOXIDADE DOS COMPOSTOS.....	24
3.5. INTERAÇÃO PARASITA-CÉLULA HOSPEDEIRA.	24
3.6. AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE INFECÇÃO APÓS INTERAÇÃO COM OS COMPOSTOS	25
3.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1. EFEITO DO METALOCOMPLEXO N0414 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO TEMPO DE 24H	27
4.2. EFEITO DO METALOCOMPLEXO N0414 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO TEMPO DE 48H	28
4.3. EFEITO DO METALOCOMPLEXO N5814 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO TEMPO DE 24H	29
4.4. EFEITO DO METALOCOMPLEXO N5814 EM DIFERENTES	

CONCENTRAÇÕES NO TEMPO DE 48H	30
4.5. ANÁLISE DO T.GONDII EM CÉLULAS LLC-MK2 TRATADAS OU NÃO COM OS COMPOSTOS METALOCOMPLEXOS N0414 E N5814 POR MICROSCOPIA ÓPTICA	31
4.6. ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS LLC-MK2 TRATADAS OU NÃO COM OS METALOCOMPLEXOS N0414 E N5814.....	35
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO.	46
7. REFERÊNCIAS.....	47

RESUMO

Toxoplasma gondii, o agente da toxoplasmose, é um protozoário intracelular obrigatório capaz de infectar um amplo espectro de células de vertebrados. A toxoplasmose é uma patologia relacionada a severos danos a hospedeiros imunodeprimidos e sua quimioterapia atual é bastante restrita, sendo mais utilizada a combinação de sulfadiazina e pirimetamina, terapia associada a reações adversas. Este fato evidencia a importância do estudo de novas drogas contra o *Toxoplasma gondii*. Atualmente tem sido estudado o efeito biológico de novos compostos metalocomplexos, compostos inorgânicos que apresentam promissoras atividades biológicas como fungicida, bactericida e antiviral. Os metalocomplexos, os compostos férricos dinuclear N0414 (Fe alfa-naftol BMPA) e N5814 (Fe beta-naftol BMPA) apresentaram atividade contra o *Toxoplasma gondii in vitro* e não foram tóxicos às células LLC-MK2, sendo capazes de reduzir a atividade de enzimas antioxidantes cruciais para a defesa do parasita. Neste projeto, foi investigada a atividade de compostos da família dos metalocomplexos como os compostos coordenados à sulfadiazina, tais como os compostos de núcleo férrico N0414 e N5814, que apresentaram atividade anti-*Toxoplasma gondii* e foram capazes de eliminar a infecção de quase todas as células hospedeiras. Em etapas futuras, será investigado que tipo de morte o parasita sofre após tratamento com os compostos através de análise de ultraestrutura e utilização de marcadores específicos por microscopia de fluorescência. Devido aos promissores resultados encontrados nesse trabalho, para comprovação da sua eficácia, os compostos também serão utilizados em testes *in vivo* com modelos murinos sob a fase aguda da toxoplasmose.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; toxoplasmose; metalocomplexos; quimioterapia.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii, toxoplasmosis agent, is an obligate intracellular protozoan that is able to infect a broad spectrum of vertebrate's cells. Toxoplasmosis is a pathology related to severe damages to immunocompromised hosts and its current chemotherapy is quite restricted, being more used the combination of sulfadiazine and pyrimethamine, which is a therapy associated with adverse reactions. This fact highlights the importance of the study of new drugs against *Toxoplasma gondii*. Has been studied the biological effect of new metallocomplex compounds, which are inorganic compounds that present promising biological activity as fungicide, bactericide and antiviral. The metallocomplexes, dinuclear ferric compounds N0414 (Fe alfa-naftol BMPA) and N5814 (Fe beta-naphthol BMPA) showed activity against *Toxoplasma gondii in vitro* and it was nontoxic to LLC-MK2 cells, being able to reduce the activity of crucial antioxidant enzymes for the defense of the parasite. In this project, it will be investigated the activities of compounds of the metallocomplexes family as the compounds coordinated to sulfadiazine as the nucleus compound of ferric N0414 and N5814, which showed anti-*Toxoplasma gondii* activities and were able to eliminate the infection in almost all host cells. In further steps, we will investigate what kind of death the parasite undergoes after the treatment with the compounds through the ultrastructure analysis and the usage of specific markers by fluorescence microscopy. Due to the promising results found in this work, to prove their efficacy the compounds will also be used in *in vivo* tests with murine models under the acute phase of toxoplasmosis.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; toxoplasmosis; metallocomplexes; chemotherapy.

1) INTRODUÇÃO:

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório, pertence ao filo Apicomplexa e classe Sporozoa, além de ser o agente etiológico da toxoplasmose, com distribuição mundial em animais de sangue quente, incluindo humanos (LEVINE et al., 1980; LYONS & JOHNSON, 1995; LUDER et al, 2001).

As formas de *Toxoplasma gondii* que são capazes de infectar hospedeiros são: taquizoítas, presentes na fase aguda da toxoplasmose; bradizoítas (no interior de cistos teciduais) que são, usualmente, encontrados no cérebro e músculo esquelético na fase crônica da infecção; esporozoítas, presentes no interior de oocistos produzidos durante o ciclo sexual que ocorre no intestino de felinos, hospedeiros definitivos (TENTER et.al, 2000; HILL & DUBEY, 2005). Como resposta imune adaptativa, o hospedeiro enfraquece, cistos teciduais se rompem e liberam bradizoítas através de um mecanismo ainda desconhecido. Essas infecções reincidentes permitem a conversão do parasito para o estágio taquizoíta, de rápida divisão, e produzem significativa morbidade, incluindo encefalite toxoplásmica (FERGURSON et al., 1989; SULLIVAN et al., 2009).

As mais relevantes vias de transmissão em humanos são: a ingestão de comida ou água contaminadas com oocistos eliminados por gatos; ingestão de carne crua ou malcozida com cistos teciduais; e congenitamente, quando a mãe adquire a infecção pela primeira vez durante a gravidez (TENTER et al., 2000).

O ciclo se inicia (Figura 1) pela ingestão de cistos presentes em carne pelos felídeos. A parede dele é dissolvida por enzimas do estômago e intestino delgado e o parasito é liberado do cisto, penetra nas células da mucosa intestinal do animal e multiplica-se assexuadamente dando origem aos taquizoítos. Alguns dias após essa infecção, o processo de reprodução sexuada se inicia e os merozoítos formados na reprodução assexuada dão origem aos gametas (GOULART & RESENDE, 2015).

Esses gametas, masculinos e femininos, descendentes do mesmo parasita ou de dois diferentes, fundem-se dando origem ao ovo ou zigoto, que após segregar a parede cística dá origem ao oocisto. Este é expulso com as fezes dos animais após nove dias, em que cada gato expulsa mais de 500 milhões de oocistos em cada defecação. Já no exterior do hospedeiro, o oocisto sofre esporulação – divisão meiótica - novamente após alguns dias, formando-se dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos, uma forma altamente resistente, algo que garante ao parasito que sobreviva anos fora do meio intracelular. Esses esporozoítos são ativados em taquizoítos se forem ingeridos por outro animal (hospedeiro intermediário) e podem infectar e replicar em todas as células dos mamíferos, com exceção das hemácias. Uma vez ligados a uma célula do hospedeiro, o parasito a penetra e forma um vacúolo parasitóforo, dentro do qual se divide. Essa replicação do parasito continua até que seu número no interior da célula atinja uma quantidade que provoque a ruptura da célula, liberando parasitos que irão infectar outras células adjacentes (GOULART & RESENDE, 2015), como retratado na figura 1.

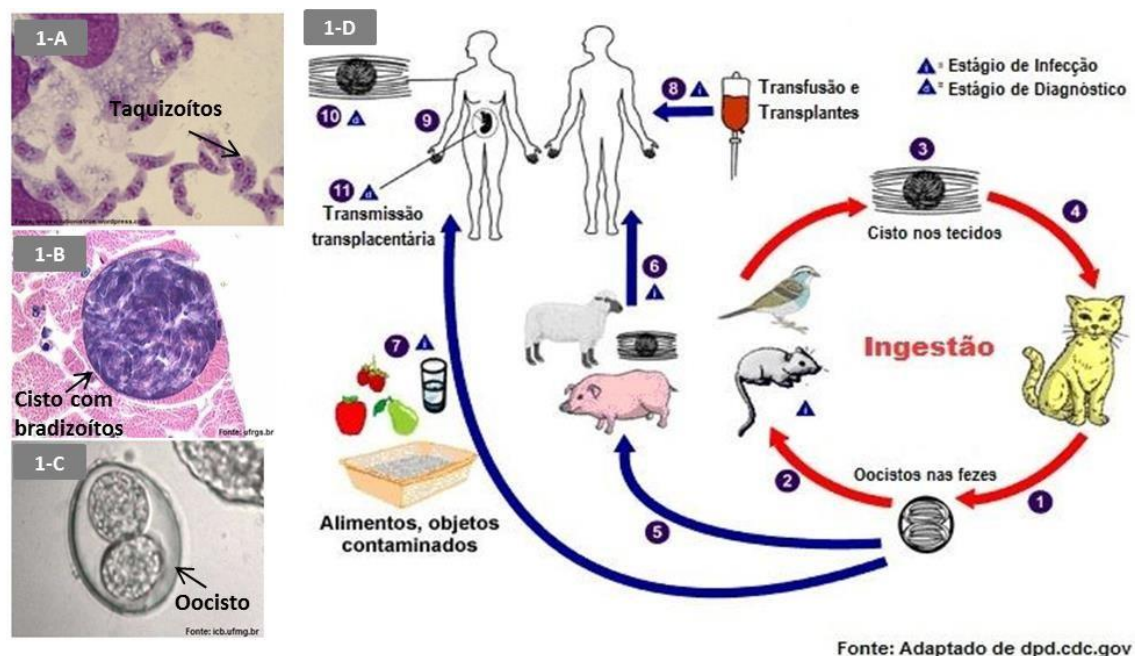


Figura 01: Formas infectantes do *T. gondii* (1A-1C) e ciclo de transmissão do parasito (1D).

Em organismos imunocompetentes, as infecções pelo *Toxoplasma gondii* raramente são graves, sendo frequentemente assintomáticas, cerca de 90% delas (KRAVETZ & FEDERMAN, 2005). Neste caso, os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos e, posteriormente, em cistos teciduais como forma de resistência, gerando a fase crônica da doença (DUBEY *et al.*, 1998; TENTER *et.al*, 2000).

Por outro lado, em indivíduos imunocomprometidos, a condição mais comum é encefalite, cujos sintomas incluem dor de cabeça, desorientação, letargia, hemiparesia, reflexos alterados e convulsões (MCAULEY *et al.*, 1994). Pneumonia e miocardite podem ocorrer também nesses indivíduos.

Em crianças infectadas congenitamente, o taquizoíta invade o cérebro e retina, resultando em consequências potencialmente graves, incluindo a diminuição da acuidade visual, retardo mental, calcificações intracranianas e também hidrocefalite (MCAULEY *et al.*, 1994). Recentemente, tem sido feito associações entre infecção com o parasito e desordens neurológicas, como a esquizofrenia (KAMELAR & DAVIS, 2012).

1.1- *Toxoplasma gondii*:

A ultraestrutura do *Toxoplasma gondii* é composta por inúmeras organelas e estruturas específicas, tais como núcleo, anéis apicais, anéis polares, conóide, róptrias, micronemas, microporo, mitocôndria, microtúbulos subpeliculares, retículo endoplasmático rugoso e liso, sistema de Golgi, ribossomos, grânulos densos e apicoplasto (Figura 2), o que remete à estrutura clássica de um eucarionte (DUBEY *et al.*, 1998).

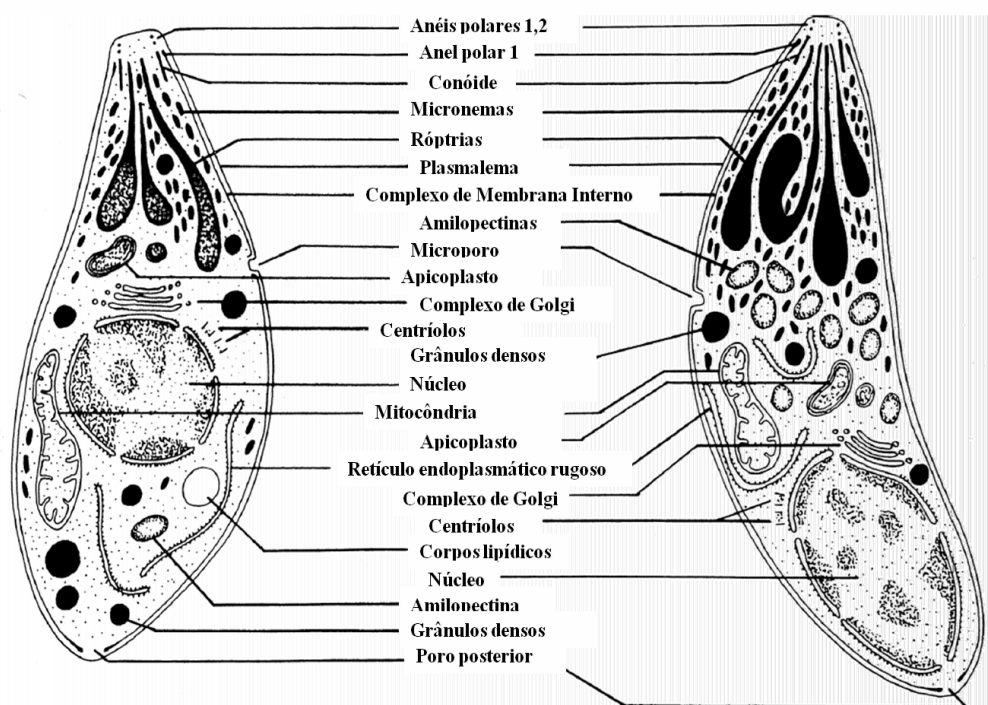


Figura 02: Desenho esquemático mostrando as diferenças ultraestruturais entre taquizoítas (esquerda) e bradizoítas (direita) (Retirado de Dubey *et al.*, 1998).

A sondagem da célula hospedeira e posterior invasão dela se dá por uma das características presente na ultraestrutura do parasito citado anteriormente, a extremidade conoidal. Em seguida, as róptrias e micronemas secretam proteínas dentro da célula hospedeira as quais garantem a infecção inicial e sua permanência, e formam assim a junção móvel e sequencialmente o vacúolo parasitóforo, por meio do deslocamento do parasito do sentido anterior ao posterior do seu corpo, entre as membranas do parasito e da célula hospedeira (DUBREMETZ *et al.*, 1998; MORDUE *et al.*, 1999).

Esse vacúolo formado apresentará componentes tanto da célula hospedeira, quanto componentes do parasita, o que promove a sua não identificação pelo sistema imune e a não fusão deste com lisossomos da célula hospedeira. Dessa forma, o parasita se desenvolverá e se replicará por reprodução assexuada, chamada de endodiogenia, dentro do vacúolo (DUBEY *et al.*, 1998).

Embora haja conhecimento sobre a biologia do *Toxoplasma gondii*, o tratamento contra a toxoplasmose ainda é limitado a poucas terapias disponíveis, e que apresentam toxicidade ao hospedeiro. Atualmente, a terapia mais efetiva contra a toxoplasmose é a administração de compostos antifolato, como a combinação de sulfadiazina e pirimetamina. As sulfonamidas atuam sinergicamente com a pirimetamina bloqueando a via metabólica relacionada à síntese do ácido fólico e folínico (GEORGIEV, 1994), afetando desta forma a síntese de timidina e a replicação do parasito.

Pacientes em tratamento com pirimetamina devem receber também administração concomitante de ácido folínico para prevenir efeitos hematológicos adversos ocasionados pela droga. Em casos de intolerância à sulfa, a substituição desta por clindamicina é recomendada, pois a combinação pirimetamina-clindamicina é tão efetiva quanto a pirimetamina-sulfadiazina durante a fase aguda da doença (DANNEMANN *et al.*, 1992; KATLAMA *et al.*, 1996).

Apesar de eficaz, essa terapia é frequentemente associada com muitos efeitos colaterais, principalmente observados em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Esses efeitos adversos podem ser supressão da medula óssea e toxicidade hematológica causado pela pirimetamina, além de ocasionar teratogenia e por isso ser contraindicado para gestantes, e/ou hipersensibilidade e reação alérgica na pele gerado pela sulfadiazina (HAVERKOS, 1987; LEPORT *et al.*, 1988; GEORGIEV, 1994; GOMELLA *et al.*, 2013).

Devido à importância médica da toxoplasmose, o desenvolvimento de novas terapias para a doença parasitária é urgente. No entanto, a principal desvantagem nesse campo é o retardo no desenvolvimento de compostos que sejam capazes de alcançar o protozoário no interior da célula hospedeira em uma concentração tóxica para este e segura também para a mesma.

Há alguns relatos na literatura mostrando que a coordenação de compostos pode ser uma alternativa interessante para terapia antiparasitária. Por exemplo, compostos contendo íons cobre ou cobalto ligados ao ligante HmtpO, onde HmtpO é {5-metil-1,2,4-triazol [1,5-a] pirimidina-7 (4H)-um}, afeta fortemente o metabolismo energético de *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* alterando estrutura de membrana de organelas e induzindo morte celular (RAMIREZ-MACIAS et al., 2011).

Esses compostos foram também ativos *in vitro* contra formas tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi* em concentrações similares as de compostos usados comumente na terapia clínica, como benznidazol; porém, com reduzida toxicidade para a célula hospedeira e melhor índice de seletividade. Além disso, em testes *in vivo* os compostos causaram redução da carga parasitária em relação ao tratamento com benznidazol (CABALLERO et al., 2011).

Atualmente tem sido estudado o efeito biológico de compostos metalocomplexos, compostos inorgânicos que apresentam promissoras atividades biológicas como fungicida, bactericida e antiviral (SINGH et al., 2000; NATH et al., 2001). Horn et al. (2005) mostraram que o ligante HPCINOL [1-(bis-piridina-2-ylmetil-amino)-3-cloropropano-2-ol] é um ligante promissor visando o desenvolvimento de metalofármacos, desde que seus complexos de cobre e ferro tenham promissoras atividades biológicas. O complexo de cobre [Cu(HPCINOL)Cl] apresentou atividade de nuclease e foi citotóxico para células leucêmicas (FERNANDES et al., 2006). Complexos de ferro com o mesmo ligante foram também testados biologicamente e observou-se que o composto mononuclear [Fe(HPCINOL)(Cl)₂] foi capaz de proteger *Saccharomyces cerevisiae* do estresse oxidativo, pois mimetizou superóxido dismutase e catalase (HORN JR. et al., 2010).

Esses mesmos compostos e seus derivados, Fe alfa-naftol BMPA e Fe beta-naftol BMPA foram capazes de acelerar a hidrólise de DNA em mais 108 vezes quando comparado com taxa de clivagem espontânea do DNA, revelando uma impressionante atividade de nuclease. Entretanto, suas atividades em células cancerígenas foram modestas e apresentaram muito baixa toxicidade a células mononucleares de sangue periférico humanas normais (HORN JR. et al., 2013).

A ausência de toxicidade às células do hospedeiro atuando apenas nos parasitos é um dos atrativos para utilização desses compostos inorgânicos para avaliação de sua atividade na terapia envolvendo o protozoário *Toxoplasma gondii*, uma vez que a principal desvantagem da terapia antiparasitária atual é não preservar a viabilidade dessas células.

1.2) Dados Epidemiológicos:

A prevalência de *Toxoplasma gondii* em humanos é alta devido a inúmeros aspectos sociais e econômicos, culturais, fatores climáticos, geográficos e alimentares (TENTER et.al, 2000; FIALHO et.al, 2009).

Segundo Tenter et.al (2000), nos Estados Unidos a soroprevalência é de um terço da sua população e na França de pouco mais que 85%. Entretanto, na América Latina esses dados variam entre 51% a 72%, enquanto na África por volta de 54% e 77%. O sul do continente Asiático é o que há menor incidência, em torno de 4% a 39%.

A soroprevalência de *Toxoplasma gondii* é analisada pela presença de anticorpos contra esse protozoário e, especificamente no Brasil, foi verificado que 50% das crianças e 80% das mulheres em idade fértil o possuem (DUBEY et.al, 2009).

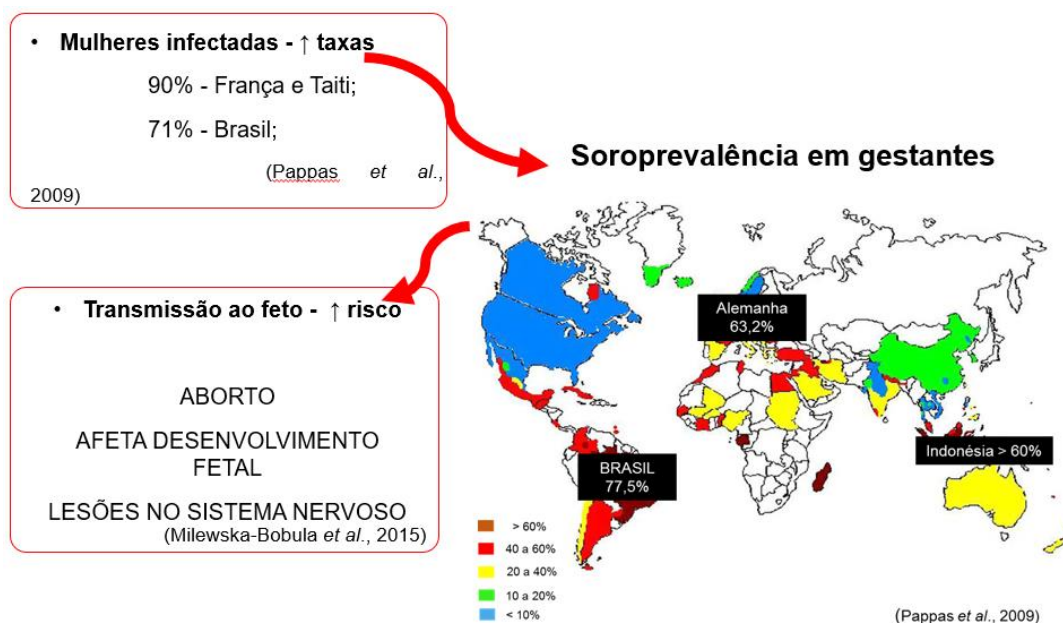


Imagem 03: Mostra a incidência de *T. gondii* em 3 países de diferentes continentes, além de explicitar que em 9 anos houve aumento de 10% de mulheres infectadas quando comparado à literatura de Tenter et.al, 2000.

2) OBJETIVOS:

2.1) OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-*Toxoplasma* de compostos metalocomplexos com núcleo férrico *in vitro*, a fim de avaliar seus possíveis mecanismos de ação, incluindo efeitos em forma taquizoíta do parasita.

2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar por microscopia óptica as células LLCMK2 infectadas com *Toxoplasma gondii* tratadas com metalocomplexos;
- Avaliar um possível efeito citotóxico do composto em relação à célula hospedeira;
- Avaliar a ultraestrutura das células tratadas ou não durante interação com *Toxoplasma gondii* por microscopia eletrônica de transmissão.

3) METODOLOGIA:

3.1) MANUTENÇÃO DOS PARASITAS.

Cepa RH - Taquizoítas da cepa RH foram mantidos por passagens intraperitoneais em camundongos suíços (CF-1). Após 48h de infecção, os parasitos foram coletados em solução salina de tampão fosfato (PBS) através de lavagem peritoneal. O lavado peritoneal sofreu centrifugação (100g; 5'; 4°C), e o sobrenadante coletado foi centrifugado (1000g; 10'; 4°C) para a obtenção das formas taquizoítas.

Os parasitas contidos no "pellet" foram ressuspensos em meio DMEM e diluídos em fixador (formaldeído 4% em PBS) para quantificação através da câmara de Neubauer ao microscópio óptico Axioplan - ZEISS.

3.2) CULTIVO E MANUTENÇÃO DA CÉLULA-HOSPEDEIRA.

Células epiteliais de rim de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), LLC-MK2 (ATCC CCL7, Rockville, MD/EUA) foram mantidas em garrafas plásticas de 25cm³, contendo meio RPMI e 5% de SFB. O pH do meio foi mantido em atmosfera com CO₂ a 5% em estufa de CO₂ à temperatura de 37°C. Vinte e quatro horas antes de cada experimento, 2x10⁵ células foram plaqueadas em placas de vinte e quatro poços contendo lamínulas de vidro, para os experimentos de interação.

3.3) COMPOSTOS METALOCOMPLEXOS.

Neste projeto foram testados compostos metalocomplexos (N0414 e N5814), (sintetizados e cedidos pelo Dr. Adolfo Horn Jr. e colaboradores do Laboratório de Ciências Químicas, UENF).

3.4) CITOTOXIDADE DOS COMPOSTOS.

Com o objetivo de avaliar o efeito citotóxico dos diferentes compostos na célula hospedeira, foram feitos experimentos controle, nas quais as células foram incubadas em meio contendo os compostos em diferentes concentrações durante 48 h. Após este período, as células foram incubadas em Rodamina 123 (10 µg/ml; 20'; 37°C) **ou** azul de Tripan (0,4%; 1') e foram quantificadas as células não-viáveis após observação por microscopia óptica.

3.5) INTERAÇÃO PARASITA-CÉLULA HOSPEDEIRA.

Parasitas ressuspensos em meio RPMI foram postos para interagir por 1 h a 37°C com células epiteliais LLC-MK2, utilizando-se uma relação de parasita:célula de 3:1 para verificação dos efeitos antiproliferativos, 10:1 para experimentos de microscopia eletrônica. Após a interação, as células foram lavadas com PBS para remoção de parasitos extracelulares. Os compostos foram adicionados após 1 h de interação por até 48h para os ensaios de curvas de crescimento e obtenção do IC50 dos compostos.

3.6) AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE INFECÇÃO APÓS INTERAÇÃO COM OS COMPOSTOS.

Após 1h de interação do parasito com a célula hospedeira, no período de 24h e 48 h em contato com as drogas, as células foram fixadas em solução de formaldeído nascente 4% em PBS, coradas com corante Giemsa 10% em água destilada, desidratadas em diferentes concentrações de acetona-xilol: 1) 100% acetona; 2) 100% acetona; 3) 70% acetona e 30% xilol; 4) 30% acetona e 70% de xilol; 5) 10% acetona e 90% de xilol; 6) 100% xilol. Após desidratação as lamínulas foram montadas sobre gotas de Entellan. As lâminas prontas foram observadas ao microscópio óptico Axioplan - ZEISS. O índice de proliferação foi determinado através da análise de número total de 100 células infectadas em duplicata de cada condição do experimento. Os resultados foram representativos de três experimentos diferentes, utilizando o teste t de "student" como ferramenta estatística.

3.7) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.

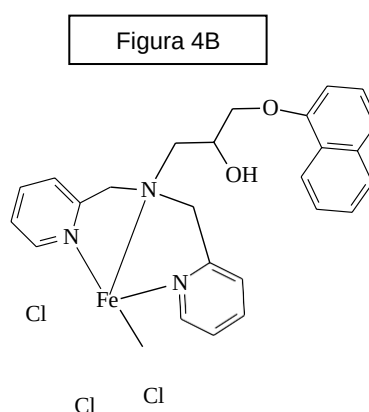
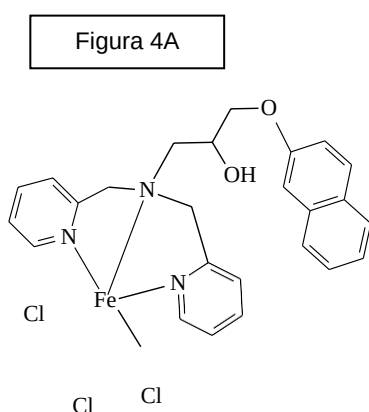
Com o objetivo de avaliar a ultraestrutura dos parasitas, na ausência e presença dos diferentes compostos, experimentos para microscopia eletrônica de transmissão, com diferentes tempos de interação foram preparados. As amostras foram fixadas em solução contendo glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M , pH 7.4. As células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas por 40 minutos no escuro em solução de tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto de potássio a 1.25% e 5mM de CaCl₂ em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.4. As células foram lavadas no mesmo tampão, desidratadas em acetona e embebidas em resina epóxi. Seções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI SPIRIT 120 Kvolts.

4) RESULTADOS:

Nosso grupo tem testado diferentes compostos metalocomplexos devido as suas características e as atividades biológicas que apresentaram previamente, como atividade anti-*Toxoplasma*. Os compostos N0414 e N5814 (Figura 4) aparecem, dentre outros, como candidatos devido aos seus efeitos potenciais contra o parasito em baixas concentrações e que, ao mesmo tempo, mantenham a baixa toxicidade das células hospedeiras.

Ambos compostos metalocomplexos apresentam núcleo férrico, o que os difere dos demais compostos analisados e estudados nas literaturas, visto que seus núcleos metálicos utilizados são os mais variados, dentre eles, os de cobre, ouro e prata.

Algumas das vantagens desses fármacos é a de apresentar um aumento da lipofilicidade, pois facilita a passagem do composto através das membranas biológicas. Esse sinergismo do metal com o ligante faz com que necessite de menores concentrações para obtenção da atividade biológica necessária e reduz ainda os efeitos colaterais célula hospedeira, além de gerar reversão de perfis de resistência da célula-alvo também (BERALDO et.al, 2005; AHMAD et.al, 2006; BRUIJNINCX & SADLER, 2008).



Legenda: Figura 04A: N5814 (Fe beta-naftol BMPA); Figura 04B: N0414 (Fe alfanaftol BMPA).

4.1) EFEITO DO METALOCOMPLEXO N0414 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO TEMPO DE 24H:

Pode-se notar no gráfico diferentes concentrações utilizadas para avaliar o grau de toxicidade necessário do composto N0414 em 24h para que não danifique a célula hospedeira, mas alcance o parasito dentro dela. Nota-se ainda que a partir de 10 μ M o composto gera perda da viabilidade celular.

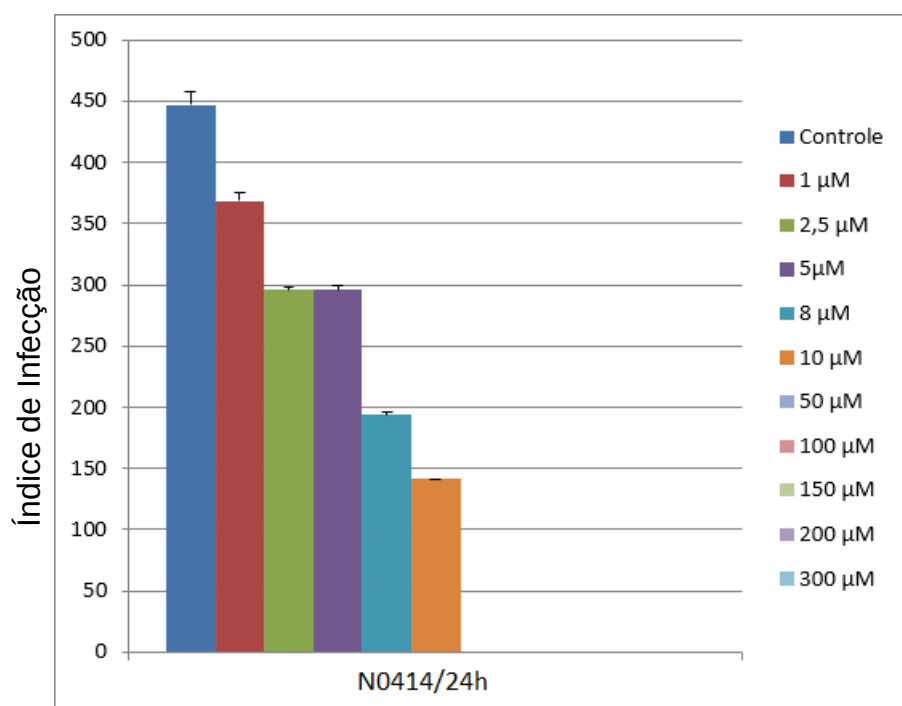


Figura 05: Gráfico representativo de diferentes concentrações do composto N0414 em 24h.

4.2) EFEITO DO METALOCOMPLEXO N0414 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO TEMPO DE 48H:

Nota-se no seguinte gráfico concentrações distintas utilizadas para avaliar o grau de toxicidade necessária do composto N0414 em 48h para que alcance o parasito dentro da célula hospedeira, mas não a afete. Pode-se notar ainda que a partir de 10 μ M o composto gera perda da viabilidade celular.

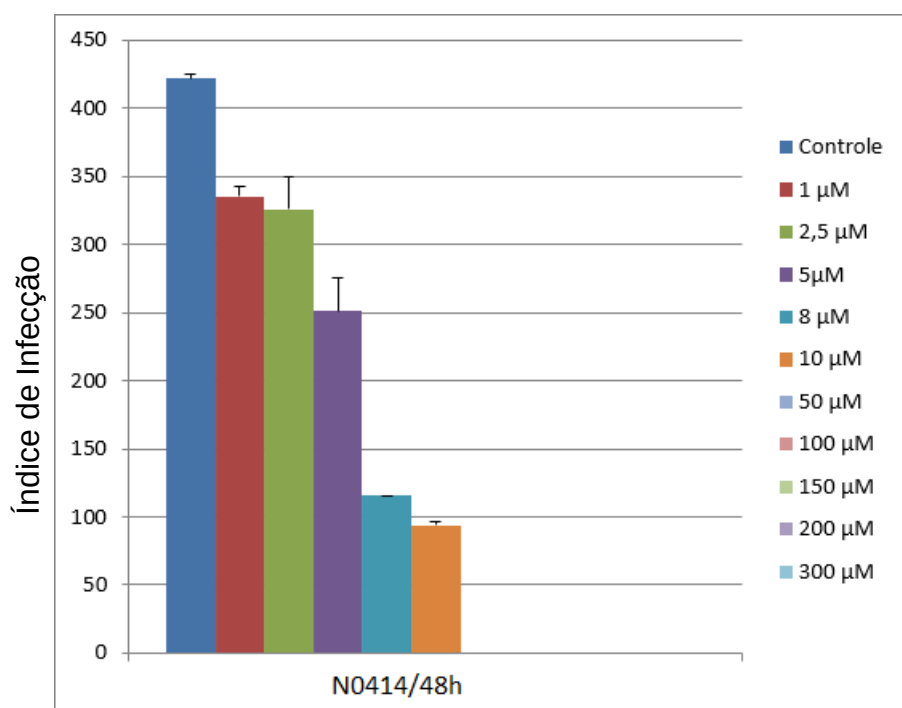


Figura 06: Gráfico representativo de diferentes concentrações do composto N0414 em 48h.

4.3) EFEITO DO METALOCOMPLEXO N5814 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO TEMPO DE 24H:

No gráfico abaixo pode-se verificar concentrações distintas utilizadas para avaliar o nível de toxicidade seguro do composto N5814 em 24h para a célula hospedeira, mas que ao mesmo tempo alcance o parasito dentro da mesma. Pode-se verificar ainda que a partir de 50 μ M o composto gera perda da mais viabilidade celular.

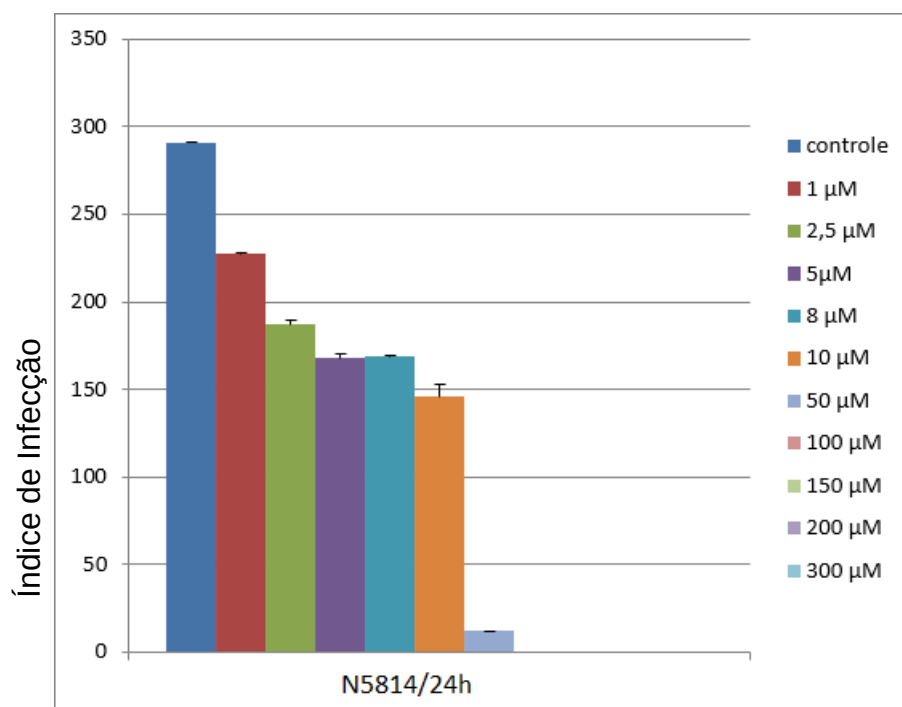


Figura 07: Gráfico representativo de diferentes concentrações do composto N5814 em 24h.

4.4) EFEITO DO METALOCOMPLEXO N5814 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO TEMPO DE 48H:

No gráfico seguinte pode-se verificar concentrações diferentes utilizadas para avaliar o grau de toxicidade seguro do composto N5814 em 48h para a célula hospedeira, mas que ao mesmo tempo alcance o parasito dentro da mesma. Pode-se verificar ainda que a partir de 100 μ M o composto gera perda da mais viabilidade celular.

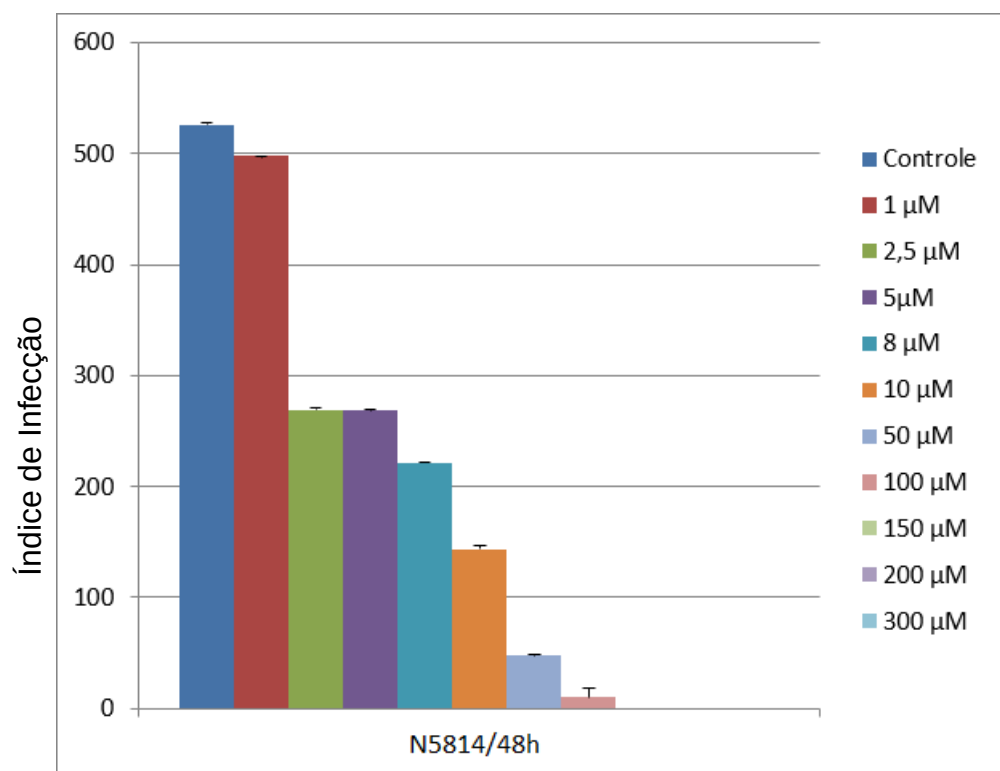


Figura 08: Gráfico representativo de diferentes concentrações do composto N5814 em 48h.

4.5) ANÁLISE DO *T.GONDII* EM CÉLULAS LLC-MK2 TRATADAS OU NÃO COM OS COMPOSTOS METALOCOMPLEXOS N0414 E N5814 POR MICROSCOPIA ÓPTICA:

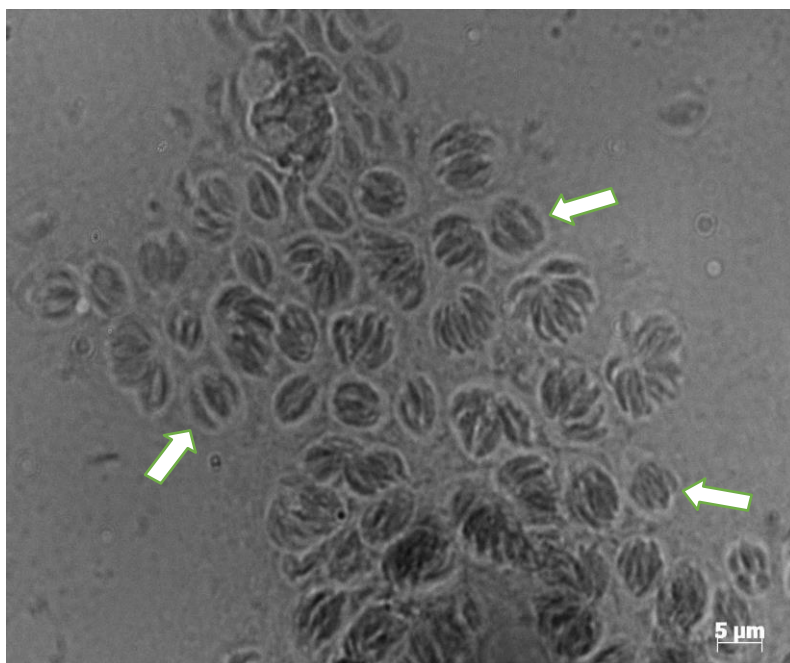


Figura 09: Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* sem tratamento no período de 24h pós infecção. Note a presença do parasito (seta).

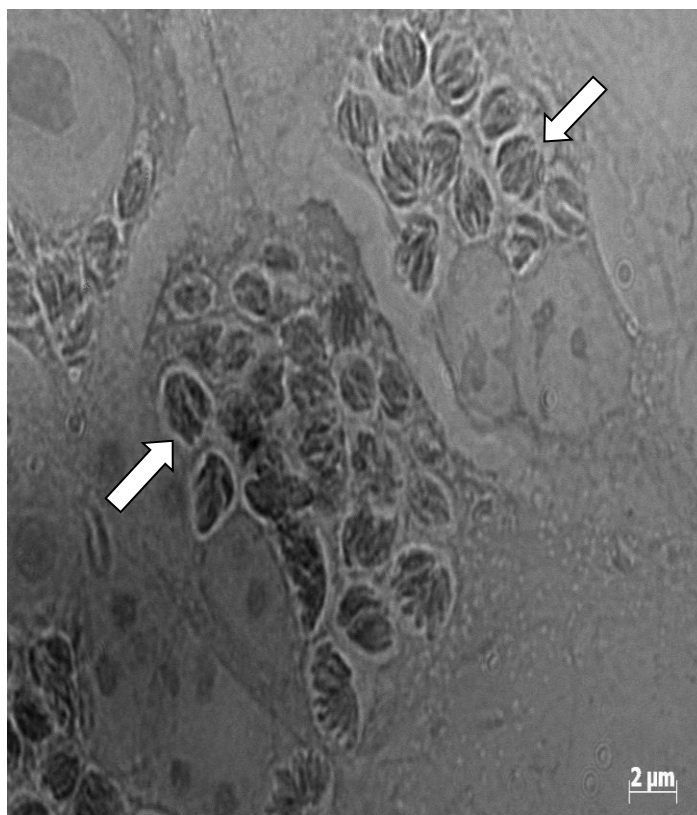


Figura 10: Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* sem tratamento no período de 48h pós infecção. Note a presença do parasito (seta).

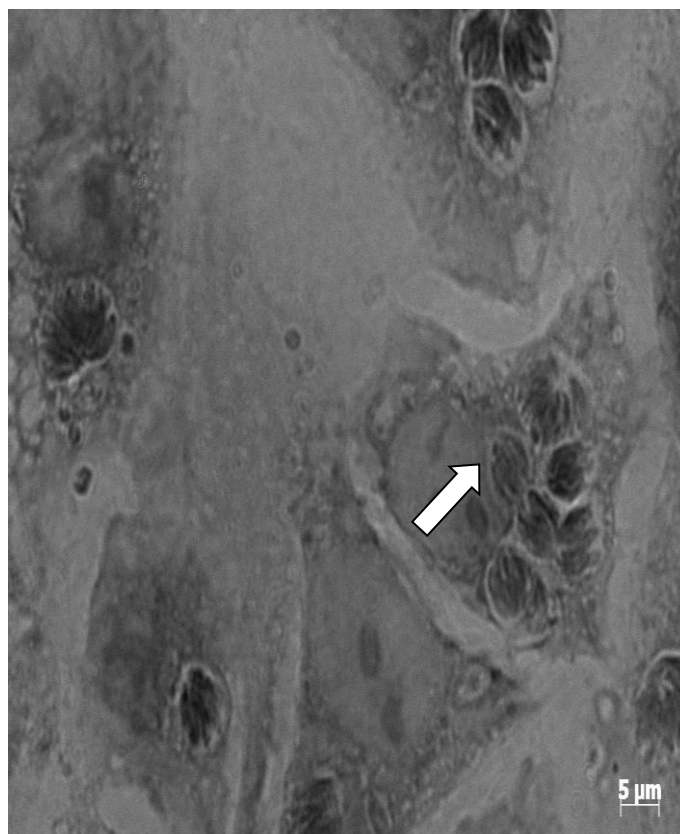


Figura 11: Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* tratada na concentração de 8 μM no período de 24h pós infecção. Note a diminuição da presença do parasito (seta).

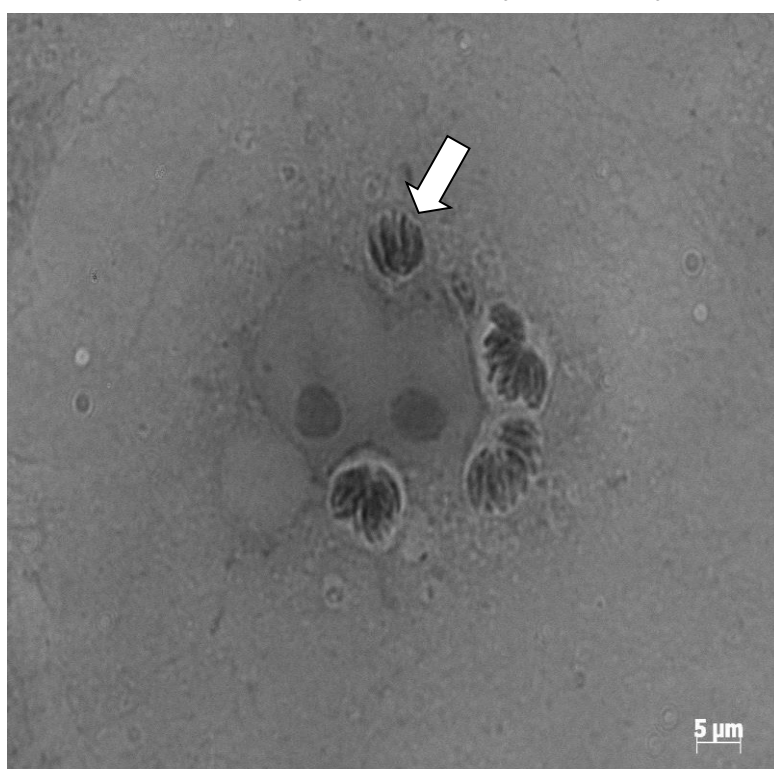


Figura 12: Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* tratada na concentração de 8 μM no período de 48h pós infecção. Note a diminuição da presença do parasite (seta).

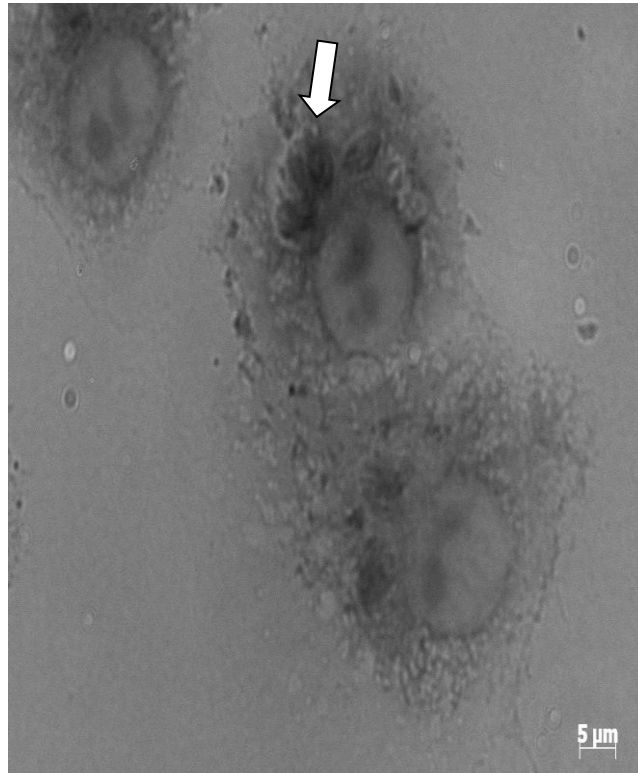


Figura 13: Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* tratada na concentração de 10 μ M no período de 24h pós infecção. Note a diminuição da presença do parasito (seta) em relação ao controle.

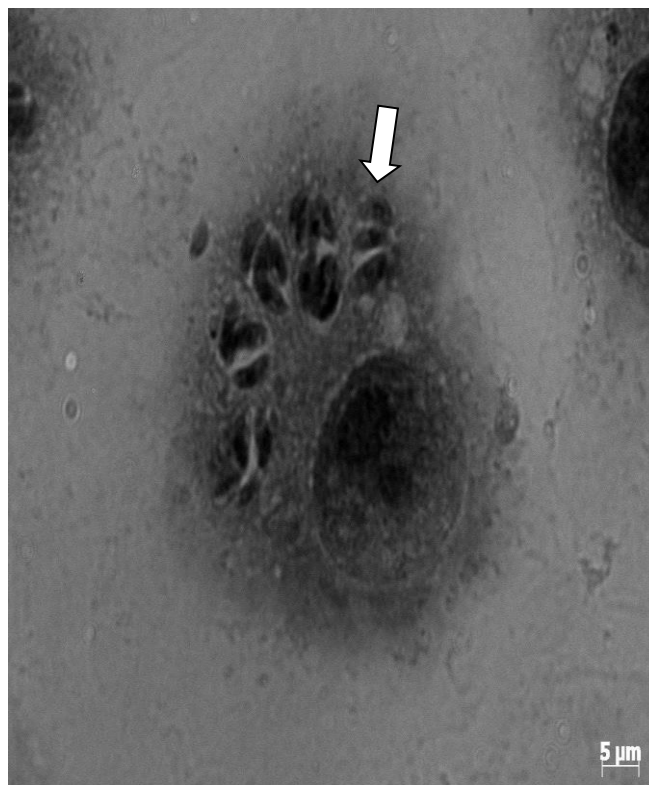


Figura 14: Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* tratada na concentração de 10 μ M no período de 48h pós infecção. Note a diminuição da presença do parasito (seta) em relação ao controle.

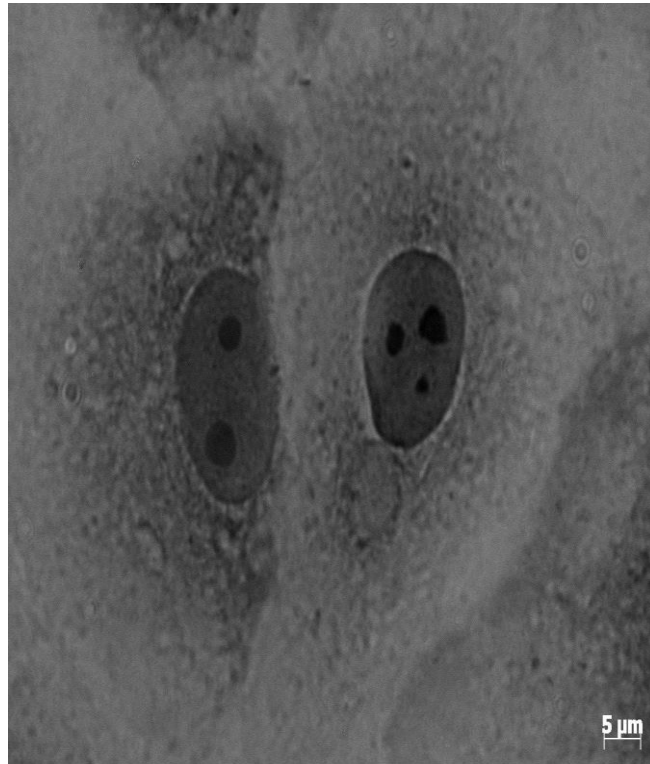


Figura 15: Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* tratada na concentração de 50 μ M no período de 24h pós infecção. Note a ausência do parasito em relação as demais concentrações.

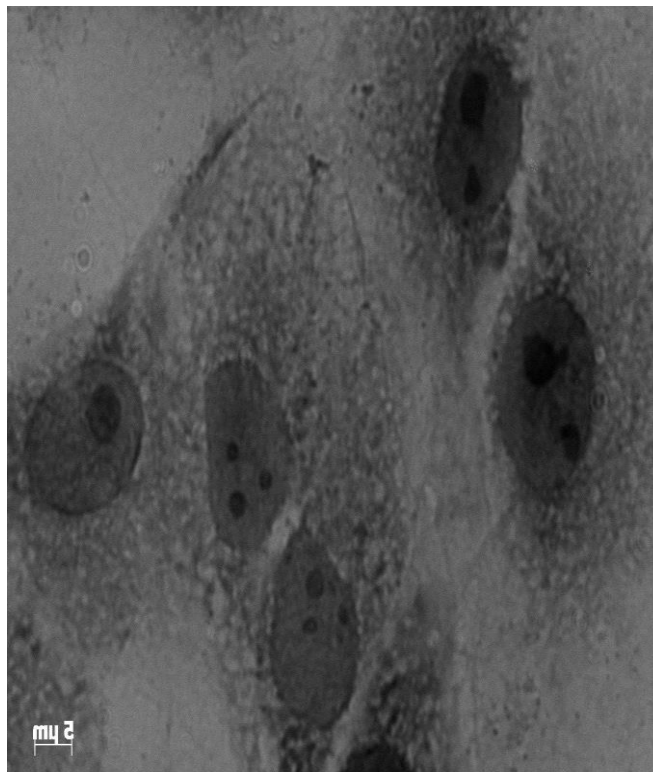


Figura 16: Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* tratada na concentração de 50 μ M no período de 48h pós infecção. Note a ausência do parasito em relação as demais concentrações.

4.6) ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE CÉLULAS LLC-MK2 TRATADAS OU NÃO COM OS METALOCOMPLEXOS N0414 E N5814:

Com a análise da ultraestrutura do parasito em células LLC-MK2 não-tratadas pode-se observar que houve integridade parasitária mantida (Figura 17). Já as células tratadas com os metalocomplexos sofreram alterações, tais como grânulos de amilopectina (Figuras 18, 19 e 20), presença do parasito necrosado (Figuras 21, 22, 23 e 24), falha na endodiogenia (Figuras 25, 26 e 27), extração citoplasmática do parasito (Figura 28), estrutura do parasito alterada (Figura 29) e desorganização do Retículo Endoplasmático (Figura 30).

Sugere-se, portanto, que a presença desses grânulos ocorre por um estresse gerado ao parasito, o qual inicia uma divisão celular lenta. Além disso, a falha na endodiogenia ocorre quando a divisão do parasito é feita de forma irregular.

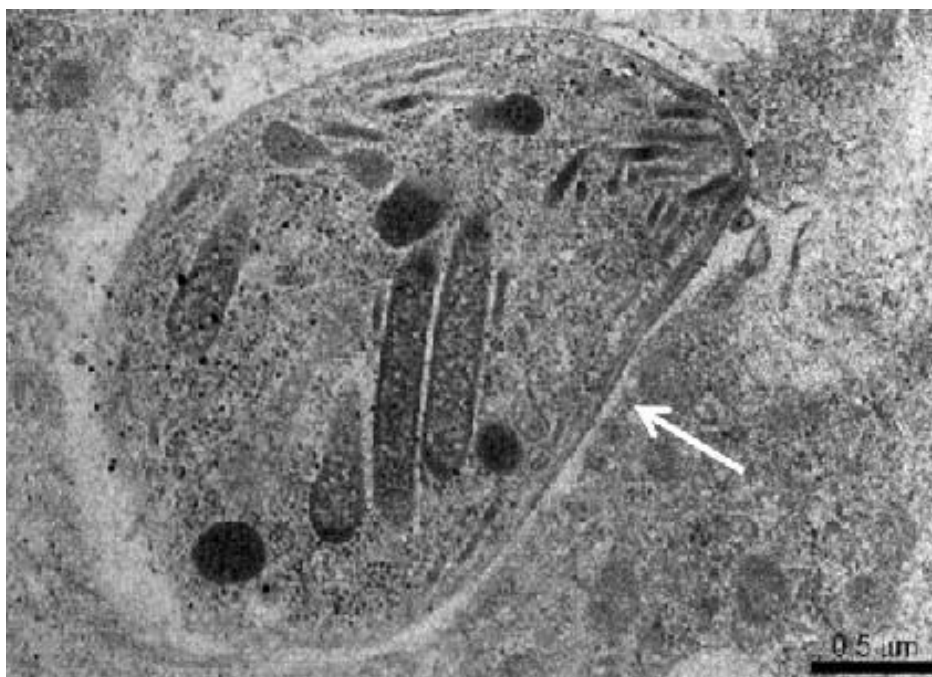


Figura 17: Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* sem tratamento no período de 48h pós infecção. Note a preservação da estrutura típica do parasito.

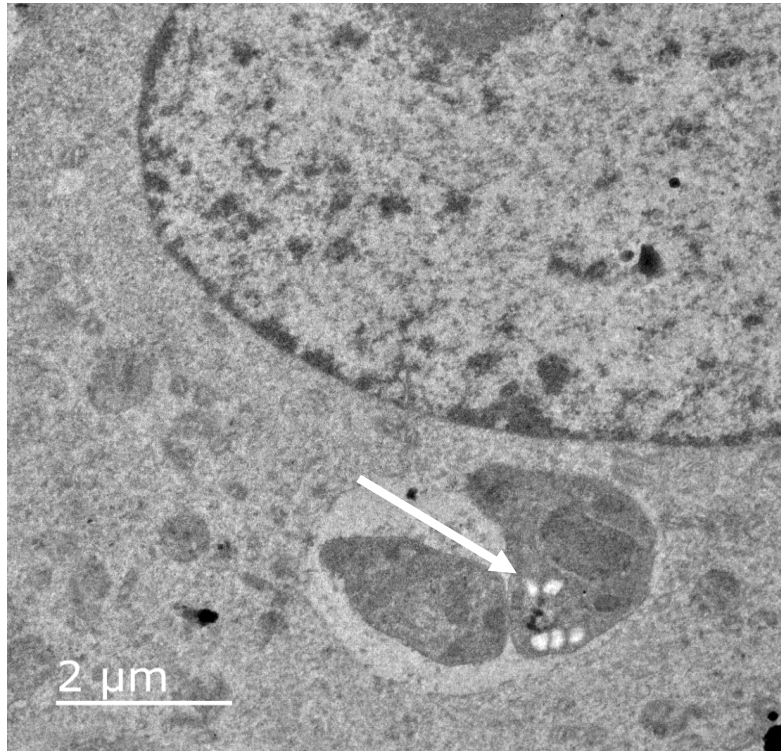


Figura 18: Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 24 horas. Note a presença de grânulos de amilopectina (seta).

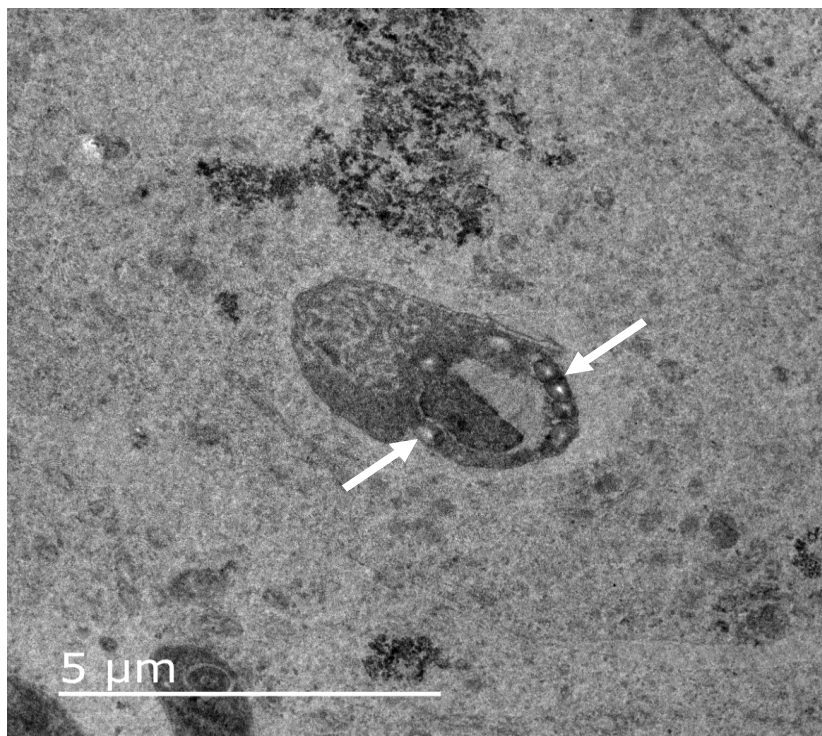


Figura 19: Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 24 horas: Note indicado pelas setas a presença de grânulo.

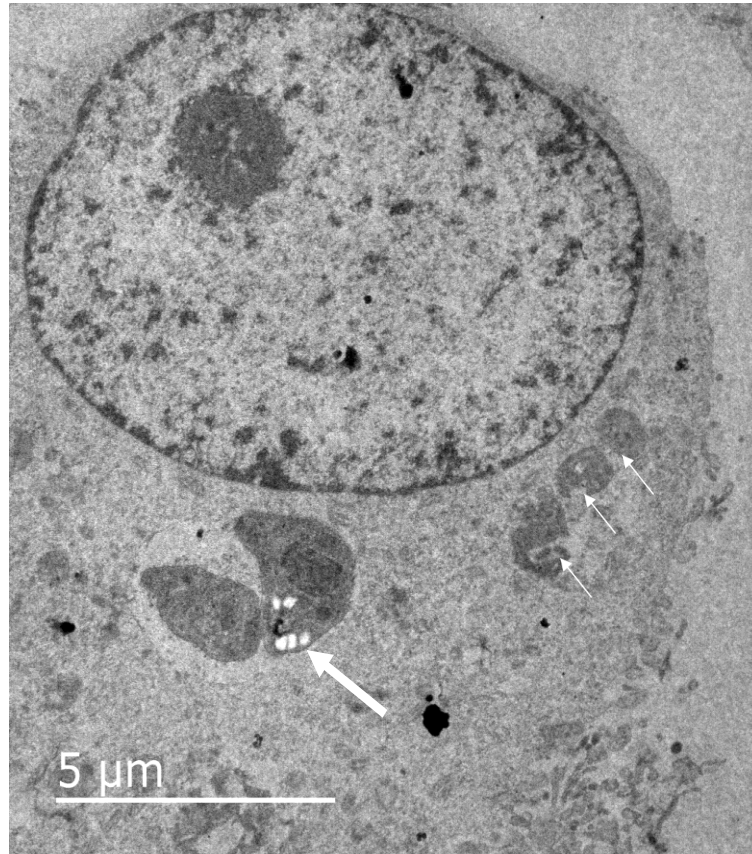


Figura 20: Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 24 horas: Note a presença de grânulos de amilopectina indicado pela seta maior e parasito necrosado indicado pelas setas menores.

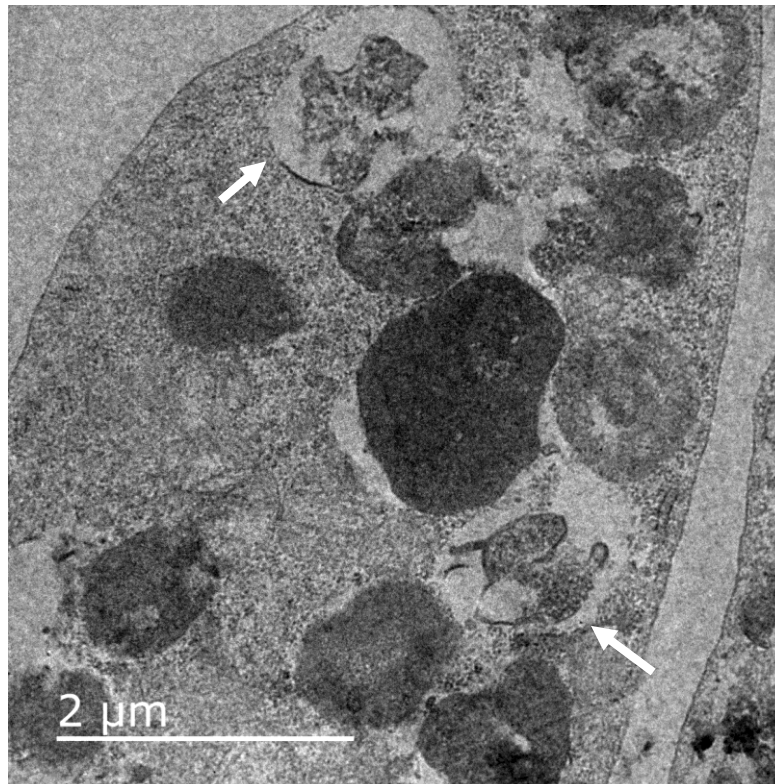


Figura 21: Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 48 horas: Note pelas setas a presença de parasitos necrosados.

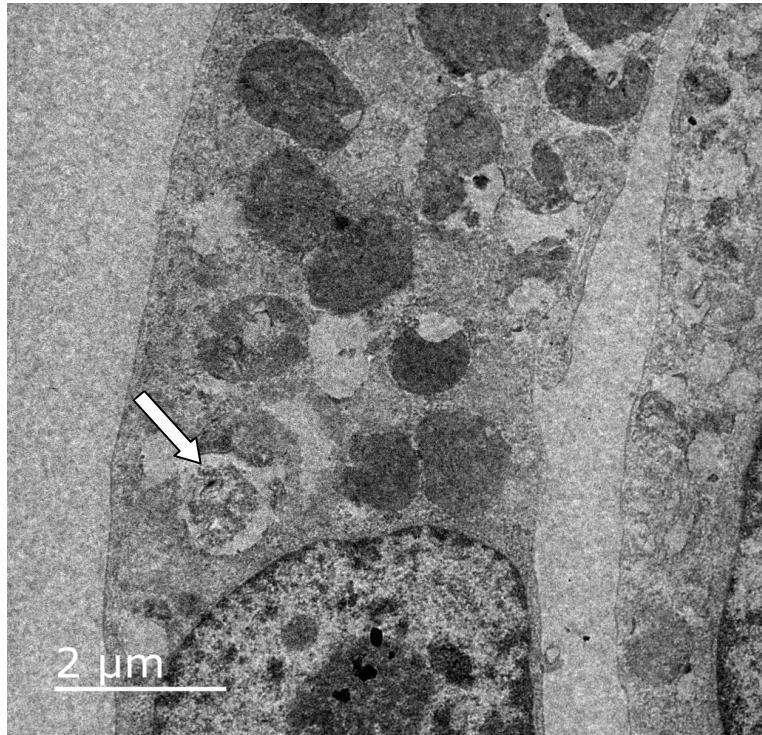


Figura 22: Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 48 horas: Presença de parasito necrosado indicado pela seta.

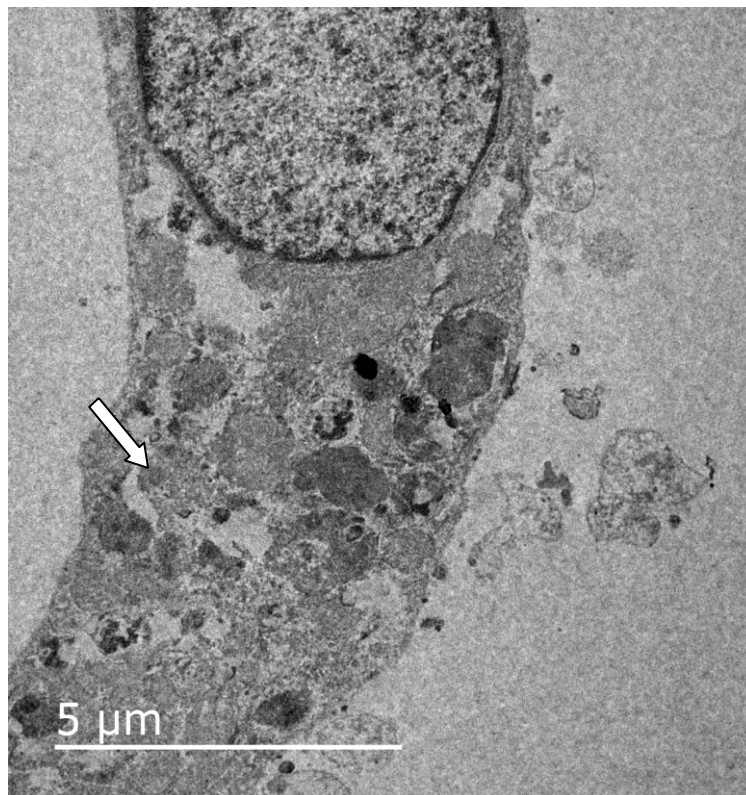


Figura 23: Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 48 horas: Presença de multiparasitas necrosados indicados pelas setas.

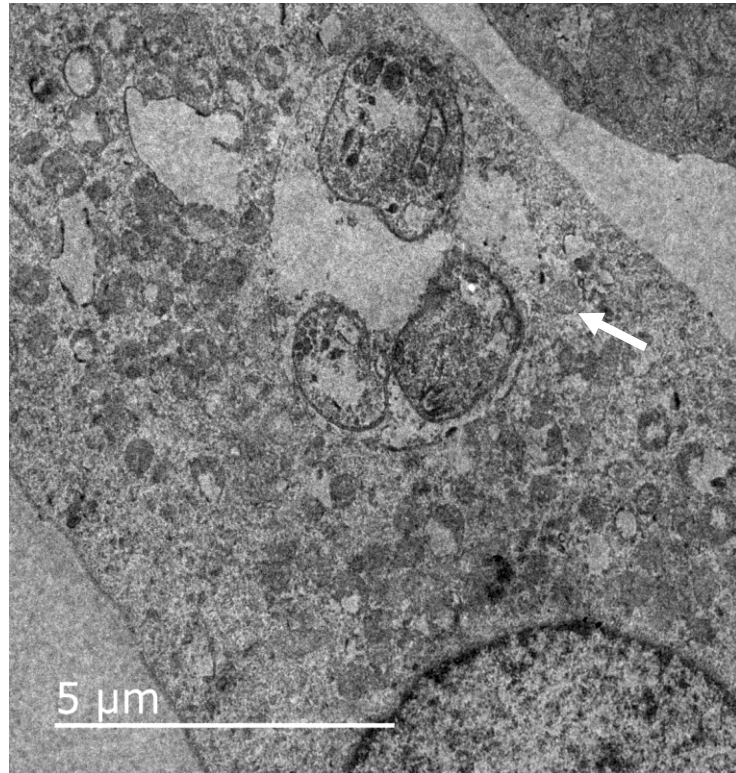


Figura 24: Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N5814 depois de 48 horas: Morte por necrose do parasito indicado pela seta.

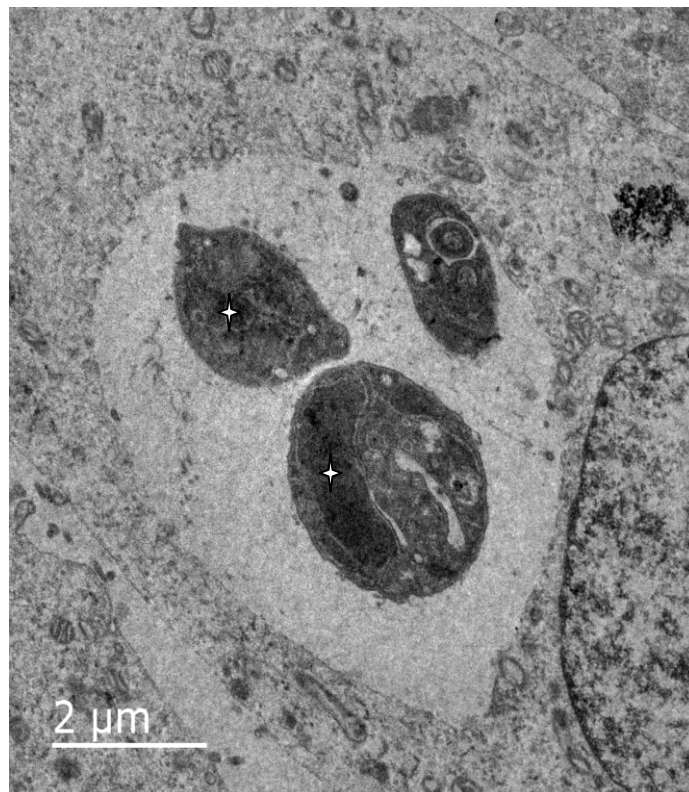


Figura 25: Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 24 horas: Note indicado pelas estrelas a divisão alterada do parasito.

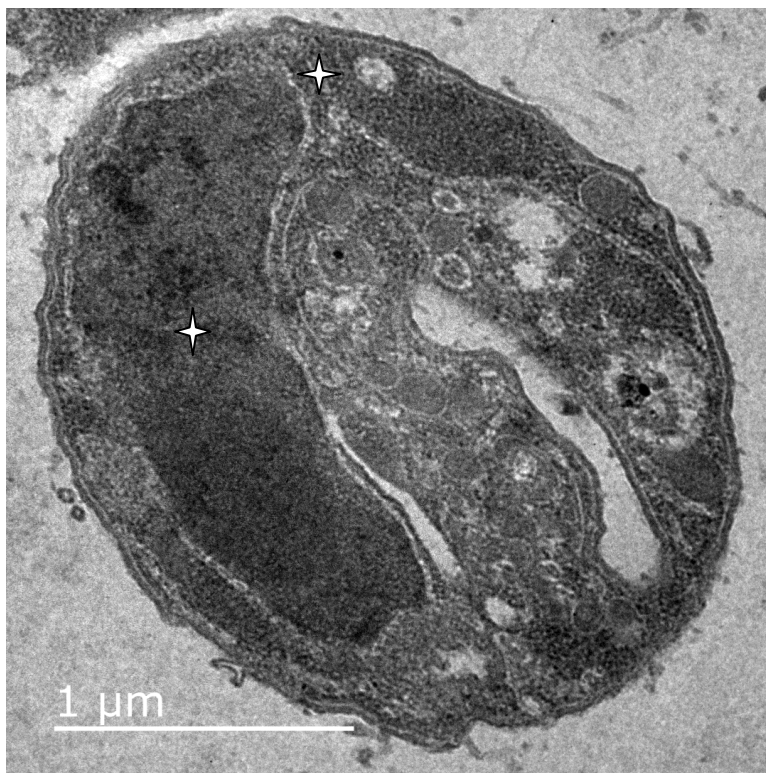


Figura 26: Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 24 horas: Note indicado pelas estrelas a confirmação de divisão alterada do parasito.

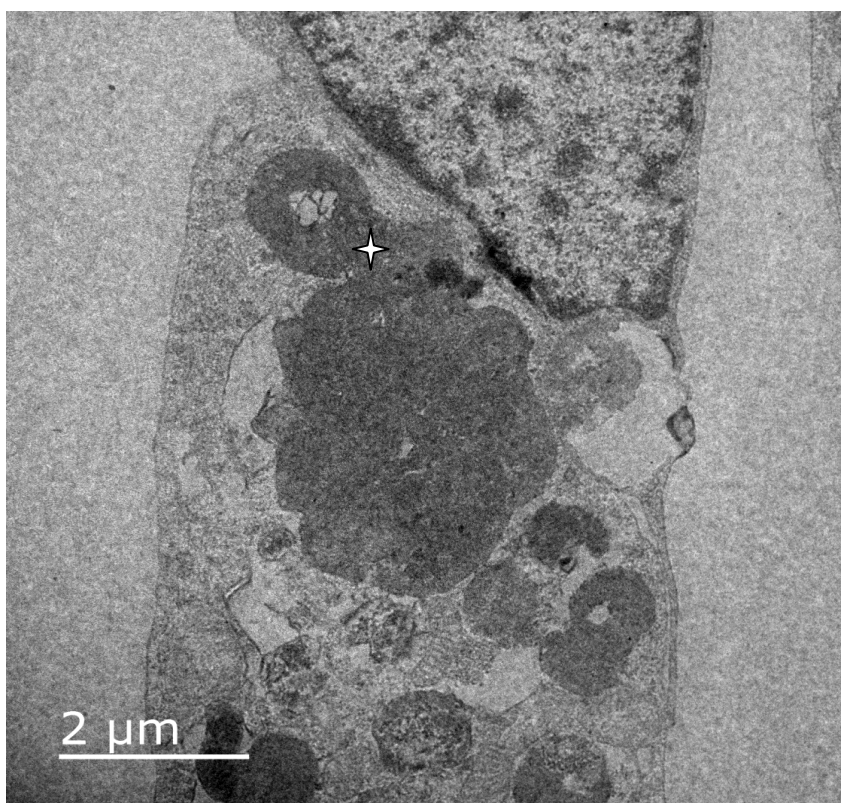


Figura 27: Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 48 horas: Falha na endodiogenia parasitária indicado pela estrela.

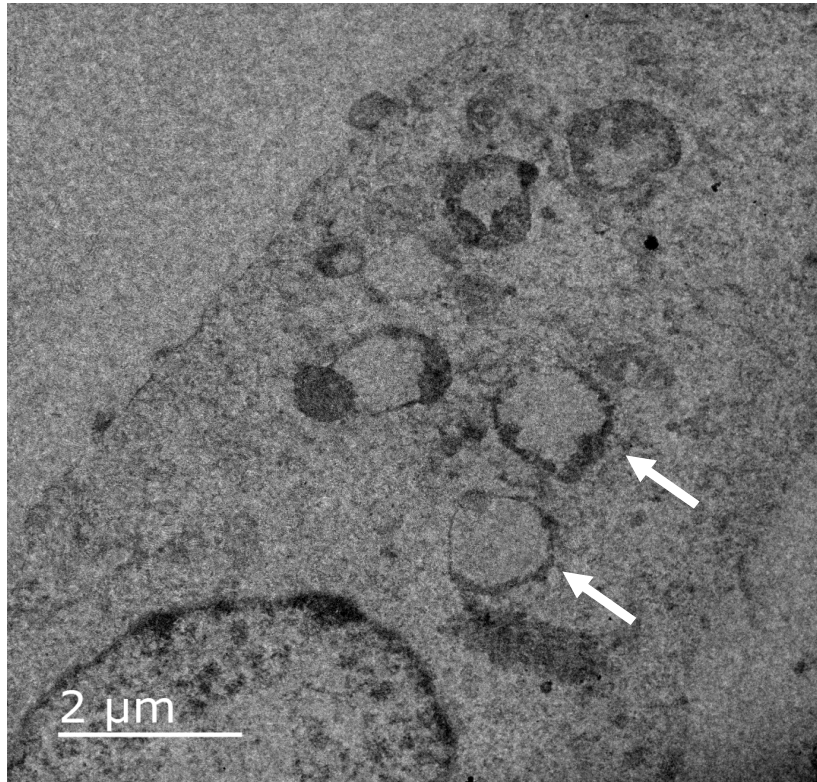


Figura 28: Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N5814 depois de 24 horas: Note indicado pelas setas a extração citoplasmática do parasito.

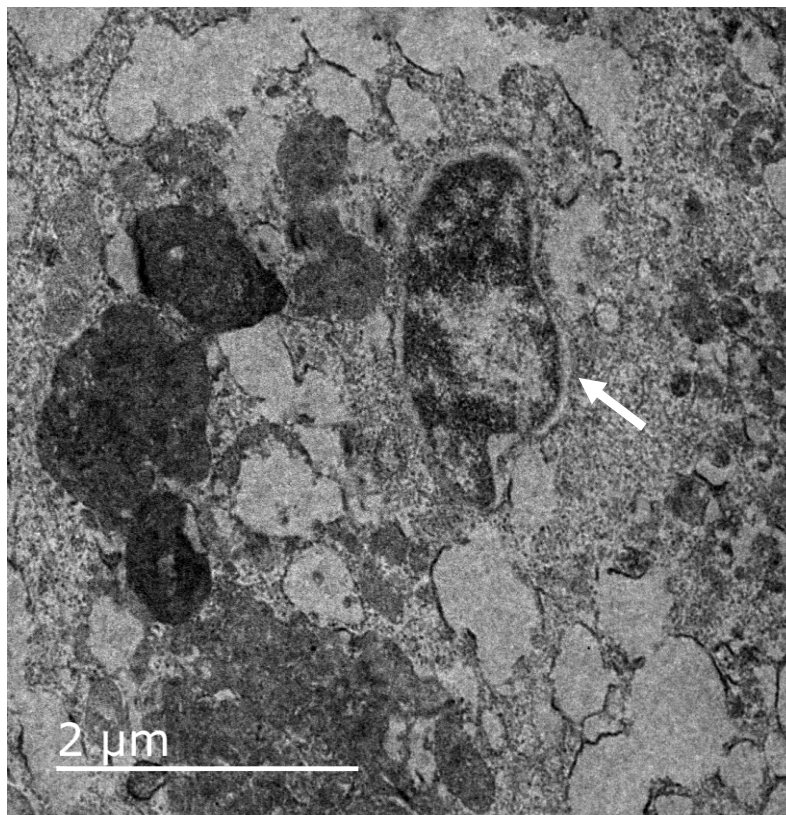


Figura 29: Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N5814 depois de 48 horas: Estrutura do parasito alterada indicada por seta.

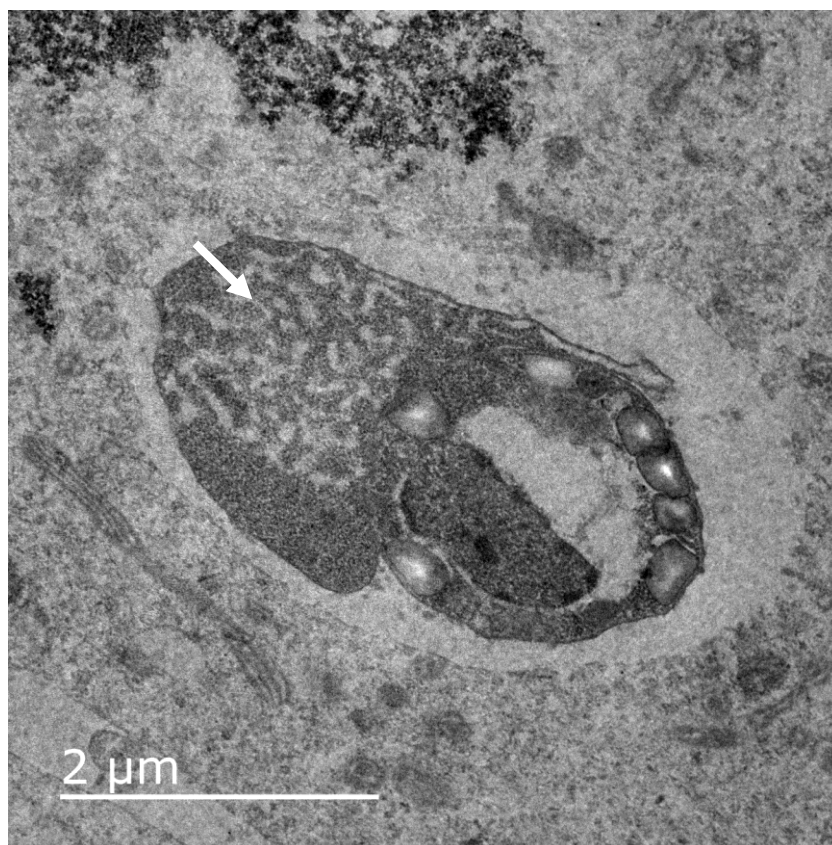


Figura 30: Microscopia Eletrônica de Transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* e tratadas com composto N0414 depois de 24 horas: Provável desorganização do Retículo Endoplasmático indicado pela seta.

5) DISCUSSÃO:

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório, do filo Apicomplexa e da classe Sporozoa, cosmopolita e que põe em risco a saúde principalmente de indivíduos imunocomprometidos ou crianças que adquirem congenitamente a doença (MCAULEY et al., 1994; MONTOYA et al., 2004).

O tratamento atual utilizado para a toxoplasmose é uma terapia combinada baseada em pirimetamina, sulfadiazina ou ácido folínico, no entanto, muitos efeitos adversos graves são gerados (GEORGIEV, 1994) e, por isso, outras drogas estão sendo estudadas para assegurar a integridade da célula hospedeira e, concomitantemente, destruir o parasito. A pirimetamina e a sulfadiazina atuam sinergicamente para tratar a toxoplasmose inibindo a proliferação e sobrevivência de *Toxoplasma gondii* por meio da inibição da via metabólica de síntese de folato (GEORGIEV, 1994; MONTOYA et al., 2004).

Além disso, a terapia atual traz consigo diversos efeitos colaterais significativos ao paciente, como toxicidade hematológica, hipersensibilidade e reações alérgicas na pele, supressão da medula óssea e efeitos teratogênicos (HAVERKOS, 1987; LEPORT et al., 1988; GEORGIEV, 1994; GOMELLA et al., 2013).

Tendo em vista os problemas apresentados pela terapia vigente, é reconhecida a necessidade de pesquisas sobre novas formas terapêuticas. Neste trabalho foram testados dois compostos metalocomplexos – N0414 e N5814 – com o intuito de analisar seu grau máximo de toxicidade sobre o *Toxoplasma gondii* de modo que não desassegure a integridade da célula hospedeira.

Há relatos anteriores em outras literaturas que testaram compostos metalocomplexos, com outro tipo de núcleo metálico que não o férrico, contra a *Leishmania infantum* e *Leishmania brasiliensis* (RAMIREZ-MACIAS et al., 2011), além de também testarem contra o *Trypanosoma cruzi* (CABALLERO et al., 2011) e obtiveram resultados significativos, gerando baixo risco à célula hospedeira ou nenhum. Além disso, esse tipo de composto é uma promissora terapia antiparasitária, bactericida, fungicida e antiviral (SINGH et al., 2000; NATH et al., 2001; RAMIREZ-MACIAS et al., 2011).

Portanto, devido resultados promissores apresentados na literatura, a realização de testes com os compostos metalocomplexos N0414 e N5814 em células LLC-MK2 foram realizados a fim de avaliar o efeito anti-*Toxoplasma gondii* e sobre a viabilidade celular, já que a terapia antiparasitária atual se mostrou tóxica as células hospedeiras.

Esse trabalho visa apresentar resultados obtidos a partir da interação quimioterápica antiparasitária de foma isolada, ou seja, sem coordenação com a terapia vigente. O tratamento proposto se diferencia dos demais pela não coordenação desses metalocomplexos com a sulfadiazina ou qualquer outro fármaco. A partir disso, pode-se supor que os efeitos colaterais antes gerados à célula hospedeira com a coordenação a sulfa não foram observados sem essa coordenação.

Dessa forma, os tratamentos das células LLC-MK2 foram feitos com diferentes concentrações de cada um dos dois compostos – N0414 e N5814, ambos durante 24h e 48h, para avaliar o nível de toxicidade suficiente deles para alcançar o parasito no interior da célula hospedeira sem que impeça sua viabilidade celular.

Verifica-se que o primeiro composto testado no tempo de 24h, N0414, atingiu seu grau máximo de toxicidade sem danificar a célula hospedeira na concentração de 10 μ M. Pôde-se ainda verificar, através da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), que esse metalocomplexo gerou tanto alterações ultraestruturais no parasito, quanto também sua morte.

O mesmo metalocomplexo testado anteriormente, embora no tempo de 48h, teve o seu grau máximo de toxicidade para o efeito antiparasitário de modo que garantisse a segurança da célula hospedeira na concentração de 10 μ M. Esse composto obteve indicação de morte do *Toxoplasma gondii* e falha na endodiogenia.

Na análise das células LLC-MK2 tratadas com o segundo composto testado – N5814 – no tempo de 24h, foi verificado que o nível tóxico máximo para a célula hospedeira e, concomitantemente, ação antiparasitária é a concentração de 50 μ M. Ainda na análise das células, notou-se que a indicação de morte celular ocorrida foi a extração citoplasmática do *Toxoplasma gondii*.

Já na análise durante o tempo de 48h desse mesmo composto, pôde-se observar que o nível de toxicidade superior a 100µM afetaria a viabilidade da célula hospedeira, logo esta é a concentração máxima para que haja indicação de morte parasitária garantindo a integridade celular. Pôde ser observado por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), a morte do parasito por necrose, assim como sua alteração estrutural.

Observa-se que o composto N0414 no tempo de 24h foi mais eficaz em relação ao de 48h, pois matou o parasito com a mesma concentração, porém em menor tempo. A mesma conclusão pode ser tirada quando comparado o primeiro composto com o N5814 no mesmo período, visto que o último precisou de uma concentração maior para apresentar indícios de morte parasitárias.

Comparativamente o composto N0414 no tempo de 48h também obteve melhor resultado que o N5814 no mesmo tempo, já que foi utilizada uma concentração muito menor para apresentar danos ao parasito. Por fim, o composto N5814/24h se mostrou melhor que o de 48h, já que o segundo precisou do dobro da concentração para apresentar necrose e alteração estrutural.

Sendo assim, o composto que apresentou resultados para uma terapia mais promissora foi o N0414 no período de 24h.

Em relação a baixa toxicidade apresentadas em modelos *in vitro* de infecção das células LLC-MK2 e tratadas com os compostos N0414 e N58140, os resultados mostram compatibilidade em relação aos obtidos de PORTES *et al.*, 2015.

Embora haja resultados satisfatórios sobre os dois compostos avaliados, novos testes em modelos *in vitro* de infecção precisam ser feitos. Além disso, modelos *in vivo* também serem levados em consideração para testes futuros. Novas pesquisas para a melhor compreensão e desenvolvimento de novos tratamentos quimioterápicos para a toxoplasmose são de grande relevância, e por este fato, a importância da continuidade no estudo para desenvolvimento desse trabalho.

6) CONCLUSÃO:

O efeito antiproliferativo dos compostos N5814 e N0414 em diferentes concentrações e tempos foi eficaz contra o *Toxoplasma gondii in vitro*, reduzindo o índice de infecção em células LLC-MK2 por morte do parasito. Os compostos também apresentaram, além da redução do índice de infecção, ação contra o parasito através de modificações de sua estrutura, extração citoplasmática e interferência na divisão parasitária.

Novos testes precisam ser realizados para elucidar a eficácia dos compostos e os mecanismos de ação que atuam sobre a célula parasitária, em especial o composto N0414, por ter apresentado melhores respostas em ação à interação parasito/célula hospedeira.

7) REFERÊNCIAS:

- 1- Caballero, A.B., Marín, C., Rodríguez-Diéguez , A., Ramírez-Macías, I., Barea, E., Sánchez-Moreno, M., Salas, J.M. **In vitro and in vivo antiparasital activity against *Trypanosoma cruzi* of three novel 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidin- 7(4H)-one-based complexes.** Journal of Inorganic Biochemistry, 105, 770–776, 2011.
- 2- Dijkovic-Djakovic, O., Milenkovic, V., Nikolic, A., Bobic, B., Grujic, J. **Efficacy of atovaquone combined with clindamycin against murine infection with cystogenic (Me49) strain of *Toxoplasma gondii*.** J Antimicrob Chemother. v. 50, p. 981-987, 2002.
- 3- Dubey, J.P.; Lindsay, D. S.; Lappin, M. R. **Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs.** Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, Philadelphia, v. 39, n. 6, p. 1009-1034, 2009.
- 4- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A. **Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts.** Clin. Microbiol. Rev., 11, 267–299, 1998.
- 5- Ferguson D. J. P., Hutchison, W. M., Pettersen, E. **Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*.** An immunocytochemical and ultrastructural study.Parasitology Research, 75, 8, 599-603, 1989.
- 6- Fialho, C. G.; Teixeira, M. C.; Araujo, F. A. P. **Toxoplasmose animal no Brasil.** Acta Scientiae Veterinariae, Porto Alegre, v. 37, n. 1, p.1-23, 2009.
- 7- Fernandes, C., Parrilha, G. L., Lessa, J. A., Santiago, L. J. M., Kanashiro, M. M., Boniolo, F. S., Bortoluzzi, A. J., Vugman, N. V., Herbst, M. H., Horn Jr., A. **Inorg. Chim. Acta.**, 359, 3167-3176, 2006.
- 8- Georgiev, V.S. **Management of toxoplasmosis.** Drugs, 48, p. 179-188, 1994.
- 9- Goulart, V., Resende, R. R. **Toxoplasmose: A culpa é dos gatos?** Nanocell News, 14, 2, 2015.
- 10- Haverkos, H.W. **Assessment of therapy for toxoplasma encephalitis. The TE Study Group.** Am. J. Med., 82, 907–14, 1987.

- 11- Hill, D.E., Chirukandoth, S., Dubey, J.P. **Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals.** Animal Health Research Reviews, 6, 1, 41–61, 2005.
- 12- Horn, Jr., A., Parrilha, G.L., Melo, K.V., Fernandes, C., Horner, M., Visentin, L.C., Santos, J.A.S., Santos, M.S., Eleutherio, E.C.A., Pereira, M.D. **An Iron-Based Cytosolic Catalase and Superoxide Dismutase Mimic Complex.** Inorg. Chem., 49, 1274–1276, 2010.
- 13- Horn Jr., A., Fernandes, C., Parrilha, G.L., Kanashiro, M.M., Borges, F.V., De Melo, E.J.T., Schenk, G., Terenzi, H., Pich, C.T. **Highly efficient synthetic iron- dependent nucleases activate both intrinsic and extrinsic apoptotic death pathways in leukemia cancer cells.** Journal of Inorganic Biochemistry, 128, 38– 47, 2013.
- 14- H.L. Singh, M. Sharma, A.K. Varshney, Synth. **React. Inorg. Met.-Org.** Chem. 30 445–456; 2000.
- 15- Kamelar S, Davis P.H. **Toxoplasma on the Brain: Understanding Host-Pathogen Interactions in Chronic CNS Infection.** Journal of Parasitology Research, 2012, doi:10.1155/2012/589295.
- 16- Katlama, C., De Wit, S., O’doherly, E., Van Glabeke, M., Clumeck, N. **Pyrimethamine-clindamycin vs. pyrimethamine-sulfadiazine as acute and long-term therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS.** Clin Infect Dis. v. 22, p. 268-75, 1996.
- 17- Leport, C., Raffi, F., Matheron, S., Katlama, C., Regnier, B., Saimot, A.G., Marche, C., Vedrenne, C., Vilde, J.L. **Treatment of central nervous system toxoplasmosis with pyrimethamine/sulfadiazine combination in 35 patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Efficacy of long-term continuous therapy.** Am J Med., 84, 1, 94-100, 1988.
- 18- Levine, N. D.; Corliss, J. O.; Cox, F. E. G.; Deroux, G.; Grain, J.; Honigberg, B. M.; Leedale, G. F.; Loeblich, A. R.; Lom, J.; Lynn, D.; Merinfeld, E. G.; Page, F. C.; Poljansky, G.; Sprague, V.; Vavra, J. and Wallace, F. G. **A newly revised classification of the Protozoa.** J Protozool, 27, 1, 37-58, 1980.

- 19- Lyons, R. E. and Johnson, A. M. **Heat shock proteins of *Toxoplasma gondii***. Parasite Immunology, 17, 353-359, 1995.
- 20- M. Nath, S. Pokharia, R. Yadav, Coord. **Chem. Rev.** 215, 99–149. 2001.
- 21- McAllister, M.M., Parmley, S.F., Weiss, L.M., Welch, V., McGuire, A.M. **An Immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (BAG5) in *Toxoplasma gondii* infected tissues cross reacts with a *Neospora caninum* bradyzoite antigen**. Protozoology, v.82, n.2, p.354-355. 1995.
- 22- Mcauley, J., Boyer, K.M., Patel, D., Mets, M., Swisher, C., Roizen, N., Wolters, C., Stein, L., Stein, M., Schey, W., Remington, J., Meier, P., Johnson, D., Heydeman, P., Holfels, E., Withers, S., Mack, D., Brown, C., Patton, D., McLeod. **Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: the Chicago Collaborative Treatment Trial**. Clin Infect Dis., 18, 1, 38-72, 1994.
- 23- Milewska-Bobula, B.; Lipka, B.; Golab, E.; Debbski, R.; Marczyńska, M.; Paul, M.; Panasiuk, A.; Seroczynska, M.; Mazela, J.; Dunin-Wąsowicz, Dorota. **Recommended management of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant woman and their children**. PRZEGL. EPIDEMIOL., 69:291-298, 2015.
- 24- Portes, J.A.. de Souza, T.G., dos Santos, T.A.T., da Silva, L.L.R., Ribeiro, T.P., Pereira, M.D., Horn Jr., A., Fernandes, C., Damatta, R.A., de Souza, W., Seabra, H. **“Reduction of *Toxoplasma gondii* development due to inhibition of parasite antioxidant enzymes by a dinuclear iron(III) compound”**. Antimicrob Agents Chemother, 59, 7374-86, 2015.
- 25- Ramírez-Macías, I., Marín, C., Salas, J.M., Caballero, A., Rosales, M.J., Villegas, N., Rodríguez-Dieguez, A., Barea, E., Sánchez-Moreno, M. **Biological activity of three novel complexes with the ligand 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidin- 7(4H)-one against *Leishmania* spp.** J Antimicrob Chemother, 66, 813–819, 2011.
- 26- Sullivan Jr., W.J. Smith, A.T., Joyce, B.R. **Understanding mechanisms and the role of differentiation in pathogenesis of *Toxoplasma gondii*—a review**. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 104, 2, 155–161, 2009.
- 27- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M. ***Toxoplasma gondii*: from animals to humans**. Int. J. Parasitol., 30, 1217-1258, 2000.