Tatiana Guinancio de Souza

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-*Toxoplasma gondii* DO COMPOSTO METALOCOMPLEXO COORDENADO A SULFADIAZINA

Rio de Janeiro

2017

Tatiana Guinancio de Souza

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-*Toxoplasma gondii* DO COMPOSTO METALOCOMPLEXO COORDENADO A SULFADIAZINA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS), como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Sergio Henrique Seabra

Rio de Janeiro

2017

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-*Toxoplasma gondii* DO COMPOSTO METALOCOMPLEXO COORDENADO A SULFADIAZINA

Tatiana Guinancio de Souza

Dissertação aprovada em: 29 / 05/ 2017

Banca examinadora

_____

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

_____

Prof. Dr. Celso Santana (Doutor, INMETRO)

_____

Prof. Dr. Fabio da S. de A. Fortes (Doutor, UEZO)

_____

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta (Doutor, UENF)

_____

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo (Doutor, UNIGRANRIO)

Rio de Janeiro

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, sem Ele eu não teria chego até aqui. Obrigada por tudo Deus, sou eternamente grata a Ti.

Grata a toda minha família, em especial meus pais. Pai: Tércio B. de Souza e Mãe: Eliana Guinancio, gratidão define. Obrigada! Vocês acompanharam meu crescimento e trabalharam dobrado, sacrificando seus sonhos em favor dos meus. Não foram apenas pais, mas amigos e companheiros mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis. Incontáveis foram às vezes que meu cansaço e preocupação foram compartilhados com vocês, procuravam sempre amenizar minha ansiedade, mantendo-me firme diante dos obstáculos, me incentivando a prosseguir. O momento que vivo agora é fascinante e só existe porque vocês se doaram em silêncio e aceitaram viver comigo o meu sonho. Presentearam-me com a riqueza do estudo e fizeram de mim não apenas um profissional, mas, sobretudo, ser humano. Amo muito vocês.

Agradeço ao meu querido orientador, Sergio Henrique Seabra. Sempre otimista e nunca me deixou desanimar. Obrigada por toda paciência e todo aprendizado durante todos esses anos. Obrigada pela oportunidade de fazer iniciação científica. Se hoje, eu cheguei até aqui, foi por você sempre acreditar em mim nos momentos em que eu mesma não acreditava. Você é um exemplo! Obrigada.

A minha eterna co-orientadora e amiga querida, Juliana Portes. Amiga foi Deus que me enviou você. Obrigada por tudo, são tantos anos e tantos ensinamentos que não caberia aqui, descrever. Grata por toda paciência, todo consolo, por acreditar em mim sempre. Você é minha referência. Obrigada, obrigada e obrigada.

Agradeço a todos os integrantes do laboratório LTBM / LTCC extensivo ao laboratório de microbiologia da Prof.ª Jessica Manya B.D. Vieira e ao laboratório do Prof.° Fábio Fortes. Obrigada a todos vocês!

Meus sinceros agradecimentos aos técnicos da UEZO, em especial: Eliandro Lima, Adriano Pereira e Patricia Nascimento, obrigada por toda ajuda durante todos esses anos.

Agradeço aos professores e amigos que fiz no programa de pós-graduação BIOTRANS. Obrigada por todos os ensinamentos e momentos partilhados.

Agradeço ao BIOTRANS, UEZO, UFRJ, UENF, FAPERJ, CNPq e CAPES que contribuíram para a realização deste trabalho. A FAPERJ, pela bolsa de mestrado cedida.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

(Cora Carolina)

RESUMO

Toxoplasma gondii, agente da toxoplasmose, é um protozoário capaz de infectar e replicar qualquer célula nucleada. A toxoplasmose é uma doença relacionada com danos graves a hospedeiros imunocomprometidos e a terapia atual é limitada e causa efeitos colaterais. Este fato destaca a importância dos estudos para criar novos fármacos ativos contra *T. gondii*. A literatura apresenta muitos estudos de efeitos de compostos baseados em metais, conhecidos como metalocomplexos, sendo ativos contra *T. gondii*. Além da atividade contra este protozoário os compostos inorgânicos mostraram atividades antifúngicas, antivirais e antibacterianas. O composto ferro dinuclear [Fe(HPClNOL) (SO4)] 2-μ-oxo, controlou a atividade de enzimas antioxidantes de *T. gondii* e foi seguro às células hospedeiras LLC-MK2. O presente trabalho investigou a atividade *in vitro* do composto metalocomplexo que têm em sua estrutura um núcleo de ferro coordenado a sulfadiazina contra taquizoítos de *T. gondii* mantido em células LLC-MK2. A análise de células infectadas e tratadas mostrou que o composto N4013.1 apresentou um valor IC_{50} igual a 3.3 μM e reduziu significativamente a taxa de infecção em comparaçãoo com células infectadas que foram tratadas apenas com sulfadiazina. Além disso, a viabilidade da célula hospedeira era elevada mesmo após tratamento com concentrações elevadas de composto. A análise por microscopia eletrônica mostrou que os parasitas tratados apresentavam inclusões citoplasmáticas semelhantes aos grânulos de amilopectina comumente encontrados nos bradizoítos. A presença de cistos de bradizoitos foi confirmada por microscopia de fluorescencia e coloração com lectina de Dolichos biflorus, específica para parede cística. Microscopia de fluorescencia utilizando marcador específico LC3B, confirmou a morte de parasitos por autofagia, no entanto, esse índice foi muito baixo. Em conclusão, o composto N4013.1 apresentou efeito potencial contra o parasito em concentrações na faixa de micromolar. Mais estudos são necessários para busca do tipo de morte sofrida pelos parasitos tratados. Assim, o novo composto coordenado apresentou um melhor desempenho do que a sulfadiazina isolada com atividade seletiva contra o parasita e a vantagem da segurança, não sendo tóxica para as células hospedeiras.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*. Metalocomplexo. Toxoplasmose.

ABSTRACT

Toxoplasma gondi, is the toxoplasmosis agent and a protozoa able to infect and replicate in any nucleated cell. Toxoplasmosis is a disease related to severe damages to immunocompromised hosts and the current therapy is limited, and cause side effects. This fact highlights the importance of studies to create new drugs actives against *T. gondii*. The literature presents many studies of effects of compounds based in metals, known as metalcomplexes, being actives against *T. gondii*. Beside the activity against this apicomplexan, the inorganic compounds showed antifungal, antiviral and antibacterial activities. The dinuclear iron compound [Fe(HPClNOL)(SO4)]2-µ-oxo, controled the activity of antioxidant enzymes of *Toxoplasma gondii* and was secure to the host cells LLCMK2.The present work investigated the activity of new metalcomplexes that have in its structure an iron core coordinated to sulfadiazine against tachyzoites of *T. gondii in vitro* maintained in LLC-MK2 cells. The analysis of infected and treated cells showed that the compound N4013.1 presented an IC_{50} value equal to 3.3 µM and reduced significantly the infection rate compared to infected cells that were treated only with sulfadiazine, with metalcomplexes or untreated cells. In addition, the host cell viability was high even after treatment with high concentrations of compound. Electron microscopy analysis showed that treated parasites presented cytoplasmic inclusions similar to amylopectin granules commonly found in bradyzoites. The presence of bradyzoite cysts was confirmed by fluorescence microscopy and Dolichos biflorus lectin staining, specific for cystic wall. Fluorescence microscopy using specific marker LC3B, confirmed the death of parasites by autophagy, however, this index was very low. In conclusion, compound N4013.1 showed a potential effect against the parasite at concentrations in the micromolar range. More studies are needed to find out the type of death suffered by treated parasites.Thus, the new coordinated compound presented a better performance than sulfadiazine alone with selective activity against the parasite and the advantage of safety, being non-toxic to the host cells.

Keywords: *Toxoplasma gondii*. Metalcomplexes. Toxoplasmosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1 - Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*.....16

Fig. 2 - Ciclo sexuado do *T. gondii*.....17

Fig. 3 - Processo de divisão de taquizoítos de *T. gondii* por endodiogenia.....19

Fig. 4 - Morfologia geral da forma taquizoíto de *T. gondii*.....22

Fig. 5 - Morfologia geral da forma bradizoíto de *T. gondii*.....24

Fig. 6 - Índice de infecção (I.I) das interações de *T. gondii* com células LLCMK2.....42

Fig. 7 - Quantificação da presença de cistos de *T. gondii* em células LLC-MK2 tratadas ou não com o composto N4013.1 e sulfadiazina por 48 h.....43

Fig. 8 - Quantificação de morte por autofagia de *T. gondii* em células LLC-MK2 tratadas ou não com o composto N4013.1 e sulfadiazina por 48 h.....44

Fig. 9 - Viabilidade das células hospedeiras LLC-MK2 após o tratamento com o composto N4013.1.41.....45

Fig. 10 - Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *Toxoplasma gondii* não tratadas e tratadas com sulfadiazina e o composto n4013.1 na concentração de 10 µM.....46

Fig. 11 - Microscopia eletrônica de transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* tratadas ou não com 10 µm de SDZ e 10 µm do composto N4013.1.....48

Fig. 12 - Microscopia de fluorescência mostrando que o tratamento com o composto N4013.1 e sulfadiazina na concentração de 10 µM durante 48h induziram o aparecimento de cistos teciduais de *T. gondii*.....49

Fig. 13 - Microscopia de fluorescência mostrando marcação negativa para LC3B.....50

Fig. 14 - Morte Celular por autofagia de *T. gondii* após o tratamento com o composto N4013.1.....51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês: acquired immunodeficiency syndrome

BAG-1 – antígeno específico de bradizoíto

CEUA – comissão de ética de uso de animais

CO_2 - monóxido de carbono

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenil-indol

DBA - lectina de *Dolichos Biflorus*

DBA – FITC – lectina de *Dilichos biflorus* conjugada a fluoresceína

DMEM- do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – dimetil sulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

HIV - vírus da imunodeficiência humana

I.I – índice de infecção

IC_{50} – concentração inibitória do crescimento celular em 50%

LC3B – cadeia leve B3, do inglês *ligth chain B3*

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

PABA - Ácido paraminobenzóico

PBS – solução salina tamponada de fosfato

PHEM – tampão PIPES, HEPES, EGTA e Magnésio

PHEM-BSA – Soro Albumina Bovina em tampão PHEM

PV – vacúolo parasitóforo, do ingles *parasitophorus vacuole*

RPMI 1640 – meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* 1640

SDZ - sulfadiazina

SFB – soro fetal bovino

U/mg – unidade por miligrama

UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense

µm - micrometro

µM - micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
2 REVISÃO DE LITERATURA 14
2.2 Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* 14
2.3 Organização ultraestrutural de *Toxoplasma gondii* 20
2.3.1 Taquizoítos 20
2.3.2 Bradizoítos 23
2.4 Toxoplasmose 25
2.4.1 Epidemiologia 26
2.6 Compostos metalocomplexos 31
3 OBJETIVOS 34
3.1 Objetivo geral 34
3.2 Objetivos específicos 34
4 METODOLOGIA 35
4.1 Manutenção dos parasitos 35
4.1.1 Taquizoítos (Cepa RH) 35
4.1.2 Cultivo da célula hospedeira LLC-MK2 35
4.2 Composto metalocomplexo 36
4.3 Interação parasito-célula hospedeira 36
4.4 Microscopia óptica 37
4.5 Ensaio antiprolifetarivo 37
4.6 Citotoxicidade do composto metalocomplexo contra a célula hospedeira 38
4.6.1 Ensaio de viabilidade celular 38
4.7 Microscopia eletrônica de transmissão 39
4.8 Imunofluorescência e ensaios para detecção de morte celular do *T. gondii* 40
4.9 Análise dos dados 40
5 RESULTADOS 41
5.1 Cálculo para determinação do IC50 do composto N4013.1 e sulfadiazina. 41
5.2 Quantificação de parede cística de *T. gondii* tratados ou não com o composto N4013.1 e Sulfadiazina após interação com células LLC-MK2. 42
5.4 Viabilidade das células hospedeiras após o tratamento com o composto N4013.1 em diferentes concentrações. 44
5.5 Análise por microscopia óptica de células LLC-MK2 tratadas ou não com o composto N4013.1 e sulfadiazina após 48 h. 45

5.6 Análise por microscopia eletrônica de transmissão de células LLC-MK2 infectadas por *T. gondii*, tratadas ou não com SDZ e o composto N4013.1 após 48 h. 47
5.7 Parede cística de *T. gondii* por microscopia de fluorescência..... 48
5.8 Avaliação de morte por autofagia de *T. gondii* após o tratamento com o composto N4013.1 e sulfadiazina..... 50
6 DISCUSSÃO 52
7 CONCLUSÕES 55
8 REFERÊNCIAS 56
ANEXO 63

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular agente etiológico da toxoplasmose, com distribuição mundial em animais homeotérmicos, incluindo humanos (LEVINE *et al*., 1980; LYONS & JOHNSON, 1995) e afeta aproximadamente um terço da população mundial. A infecção é assintomática em indivíduos imunocompetentes (TENTER *et al*., 2000) e pacientes imunocomprometidos podem manifestar sintomatologia grave (MCAULEY *et al*., 1994). Recentemente têm sido feitas associações entre infecção com o parasito e desordens neurológicas, como esquizofrenia e depressão (HALONEN & WEISS; PANDROTA, 2014).

As formas evolutivas de *T. gondii* capazes de infectar hospedeiros são: taquizoítos, presentes na fase aguda da toxoplasmose; bradizoítos (localizam-se no interior de cistos teciduais) que são comumente encontrados no cérebro e músculo esquelético na fase crônica da infecção; esporozoítos, que se encontram no interior de oocistos esporulados presentes no meio ambiante, produzidos durante o ciclo sexuado que ocorre no intestino dos felinos, hospedeiros definitivos do *T. gondii* (HILL & DUBEY, 2005).

A transmissão da toxoplasmose em humanos ocorre através da ingestão de água ou comida contaminada, oocistos esporulados presentes no meio ambiente, ingestão de carne crua ou malcozida com cistos teciduais, e congenitamente, especialmente quando a mãe adquire a infecção pela primeira vez no período gestacional (TENTER *et al*., 2000).

O tratamento para a toxoplasmose é limitado e existem poucas terapias disponíveis, que apresentam toxicidade ao hospedeiro. Atualmente a terapia para a toxoplasmose é a administração de compostos antifolato, como a combinação de sulfadiazina e pirimetamina. (HAVERKOS, 1987; LEPORT *et al*., 1988; GEORGIEV, 1994). Em casos de alergia à sulfadiazina, recomenda-se a substituição desta por clindamicina, uma vez que a combinação pirimetamina-clindamicina é tão eficiente quanto à primetamina-sulfadiazina. (DANNEMANN *et al*., 1992; KATLAMA *et al*., 1996). Em gestantes, o feto pode sofrer complicações e o tratamento é feito pela administração do fármaco espiramicina, menos tóxico, diminuindo então os riscos

para o feto (GARIN & EYLES, 1958; NIEL *et al*., 1981; LI *et al.,* 2014). Entretanto, para todos os casos é fundamental a administração concomitante de ácido folínico aos pacientes (revisto por HAVERKOS, 1987).

Devido à importância médica da toxoplasmose, o desenvolvimento de novas terapias para a doença parasitária é essencial. Tem sido estudado o efeito biológico de compostos metalocomplexos, (compostos inorgânicos) que apresentam interessantes atividades biológicas como fungicida, bactericida e antiviral (SINGH *et al*., 2000; NATH *et al*., 2001). Um dos metalocomplexos, o composto férrico dinuclear [Fe(HPClNOL)(SO4)]2-μ-oxo, apresentou atividade contra o *T. gondii in vitro* e não foi tóxico às células LLC-MK2, sendo capaz de reduzir a atividade de enzimas antioxidantes importantes para a defesa do parasita (PORTES *et al.,* 2015).

Com base nessas informações, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anti-*Toxoplasma* do composto metalocomplexo cooordenado a sulfadiazina com núcleo de ferro (N4013.1), investigando seus possíveis mecanismos de ação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório capaz de infectar todos os tipos celulares nucleados de aves e mamíferos. É considerado cosmopolita, aproximadamente um terço da população mundial apresenta soropositividade para toxoplasmose (SILVA *et al.,* 2008). O *T. gondii* foi primeiramente encontrado em um roedor na Tunísia, norte da África e descrito em 1908 por Nicolle e Manceaux, e foi ainda neste ano foi encontrado no Brasil, em um coelho por Splendore. O *T. gondii* é o agente etiológico da Toxoplasmose, doença infecciosa que pode ser congênita ou adquirida (LYONS & JOHNSON, 1995).

Este parasita pertence ao filo Apicomplexa, no qual estão incluídos diversos patógenos de importância médica e veterinária, como *Plasmodium* spp. (agente causador da malária humana), *Cryptosporidium* spp. (patógeno humano, transmitido por meio de água contaminada causando criptosporidiose) e *Eimeria* spp. (causador da coccidiose em aves, ovelhas e gados) (Sullivan & Jeffers, 2012).

2.2 Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*

O parasito *T. gondii* apresenta três formas infectantes diferentes entre si ao longo de todo o seu ciclo: taquizoítos, bradizoitos e esporozoítos. Taquizoítos (tachos = rápido, em grego) é o estágio onde o parasito se replica rapidamente nas células hospedeiras, caracterizando a fase aguda da infecção; bradizoítos (brady = devagar, em grego) se replicam lentamente e são encontrados no interior de cistos teciduais na fase crônica da infecção; e esporozoítos são as formas infectantes encontrados dentro

de oocistos presentes em fezes de felídeos (DUBEY & FRENKEL, 1973; DUBEY *et al.,* 1998).

O *T. gondii* apresenta ciclo de vida complexo, do qual participam diversos hospedeiros. O ciclo possui fase assexuada, que se passa na maioria dos animais (hospedeiros intermediários), e uma fase sexuada que se passa apenas nos felídeos (hospedeiros definitivos). Os hospedeiros se contaminam por carnivorismo, quando consomem presas infectadas com cistos tissulares de *T. gondii* ou através da ingestão de oocistos presentes na água e/ou nos alimentos contaminados com fezes de felídeos (DUBEY, 2004) (Figura1).

O ciclo assexuado ocorre nos hospedeiros intermediários e possui dois estágios de vida distintos dependendo da fase da infecção: aguda ou crônica. O estágio taquizoíto, está presente nas manifestações clínicas da fase aguda da toxoplasmose e é a responsável pela transmissão vertical para o feto via placenta (TENTER *et al*., 2000). Em indivíduos imunocompetentes os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos, de multiplicação lenta e metabolismo baixo, que formam os cistos teciduais ou tissulares. (DENKERS *et al*., 2000). O desenvolvimento de cistos tissulares em vários locais do corpo define a fase crônica do ciclo assexuado. Esses cistos são encontrados principalmente no sistema nervoso central e nos tecidos musculares esquelético onde podem permanecer pelo resto da vida no hospedeiro sem causar resposta inflamatória. Os cistos tissulares representam a fase terminal do ciclo assexuado nos hospedeiros intermediários e uma fonte importante de contaminação do homem quando ingeridos na carne crua ou malcozida de animais contaminados (DUBEY *et al.,*1998).

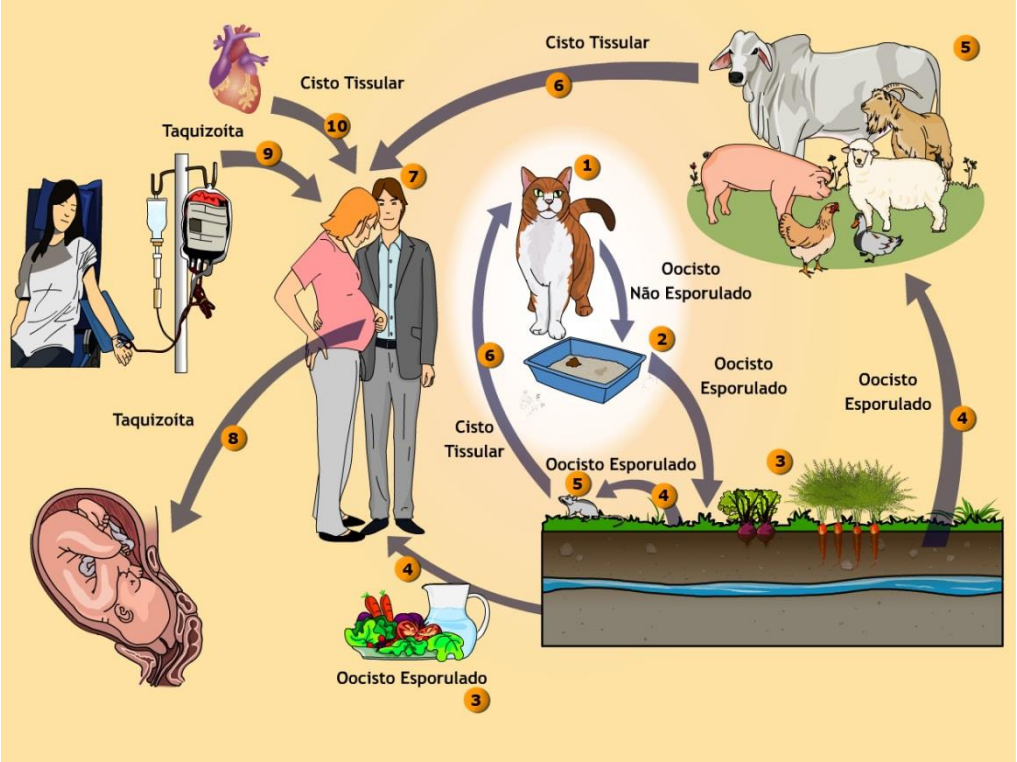


Fig. 1 - Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Os felídeos são os hospedeiros definitivos, em seu intestino ocorre à fase sexuada do ciclo, resultando na liberação de oocistos nas suas fezes (1). Após a esporulação no meio ambiente (2), os oocistos passam a ser infectivos a novos hospedeiros definitivos ou intermediários, através da ingestão de água ou alimentos contaminados com as fezes (3, 4, 5). Nos hospedeiros intermediários pode ocorrer a fase aguda da infecção, seguida da fase crônica, quando se formam cistos teciduais no tecido nervoso e muscular. Estes cistos podem ser transmitidos através da ingestão de carne contaminada (6). Em hospedeiros imunocompetentes a infecção é geralmente assintomática (7), porém imunodeprimidos ou gestantes em contato com taquizoítos (8 e 9) podem desenvolver a infecção aguda e/ou transmitir o parasito ao feto. Transplante de órgãos contaminados com cistos também é uma importante via de transmissão do parasito (10) (Autores do esquema: Marlene Benchimol, Wanderley de Souza e Paulo Crepaldi).

A fase sexuada ocorre apenas em felídeos, sendo o gato doméstico o hospedeiro mais importante, do ponto de vista epidemiológico, para a toxoplasmose humana. Na maioria das vezes esse ciclo tem início com a ingestão de cistos teciduais através do carnivorismo, a parede cística dos cistos é dissolvida por enzimas proteolíticas do estômago. Dessa forma, os bradizoítos liberados dos cistos tem acesso às células epiteliais do intestino do animal, aonde irão se multiplicar por endodiogenia ou esquizogonia, dando origem a parasitos nomeados esquizontes. A esquizogonia confere o ciclo sexuado do *T. gondii* por meio da gametogênese, onde

há formação de gametas femininos (macrogametas) e masculinos (microgametas). Os microgametas fecundam os macrogametas formando assim os zigotos (oocisto) que posteriormente serão liberados nas fezes do animal. Estes oocistos quando liberados nas fezes dos felinos amadurecem e esporulam formando em seu interior esporocistos, que contém uma das formas infectantes do *T. gondii*: esporozoíto (Figura 2). Oocistos quando liberados no meio ambiente, contaminam solo, alimentos e água, podendo através destas vias de contaminação se reiniciar o ciclo nos diferentes hospedeiros (DUBEY *et al.,*1998).

Fig. 2 – Ciclo sexuado do *T. gondii.* Cistos ingeridos por carnivorismo (1) tem a parede cística degradada no estômago e intestino dos felídeos (2). Bradizoítos liberados dos cistos infectam os enterócitos (3), se replicam por endodiogenia e/ou esquizogonia (4), gerando esquizontes que infectam novas células (5,7). O ciclo sexuado ocorre após a formação de gametas femininos (macrogametas) e masculinos (microgametas) a partir das formas esquizontes (6). Microgametas fecundam os macrogametas formando zigotos (8) que posteriormente, ao serem envoltos por uma espessa parede, se tornam oocistos que são liberados através das fezes do animal (9,10). (Autores do esquema: Marlene Benchimol, Wanderley de Souza e Paulo Crepaldi).

O *T. gondii* é capaz de se replicar e infectar qualquer célula nucleada de aves e mamíferos. Desse modo, logo após a infecção com qualquer uma das formas do parasito, estes se diferenciam em taquizoítos, que se dividem rapidamente por sucessivas endodiogenias, forma especializada de reprodução assexuada. Nesse processo, duas células filhas são formadas no interior de uma célula mãe, que se degenera no fim do processo (SHEFFIELD & MENTON, 1968). Esta forma de divisão denominada endodiogenia é característica de taquizítos e bradizoítos e é diferente do processo de divisão que ocorre no hospedeiro definitivo ou no interior do oocisto (Revisto por DE SOUZA *et al*., 2010).

A endodiogenia tem seu início marcado pelo alongamento do complexo de golgi e apicoplasto e com a divisão do centrossomo. Em seguida, as partes anteriores dos complexos internos da membrana e os microtúbulos subpeliculares das células filhas aparecem. O núcleo do parasito se modifica para um formato de ferradura, com as pontas crescendo em direção aos conóides. As células-filhas continuam a crescer até alcançarem à superfície da célula-mãe, que sofre degeneração, deixando livres as células-filhas (Figura 3). Os parasitos decorrentes das sucessivas divisões celulares se organizam em forma de rosetas dentro do vacúolo parasitóforo, com o crescimento do número de parasitos as membranas dos vacúolos podem romper-se e posteriormente levarem o rompimento da célula hospedeira quando a mesma já não pode mais suportar o crescimento e multiplicação dos taquizoítos (REY, 2002; Revisto por DE SOUZA *et al*., 2010).

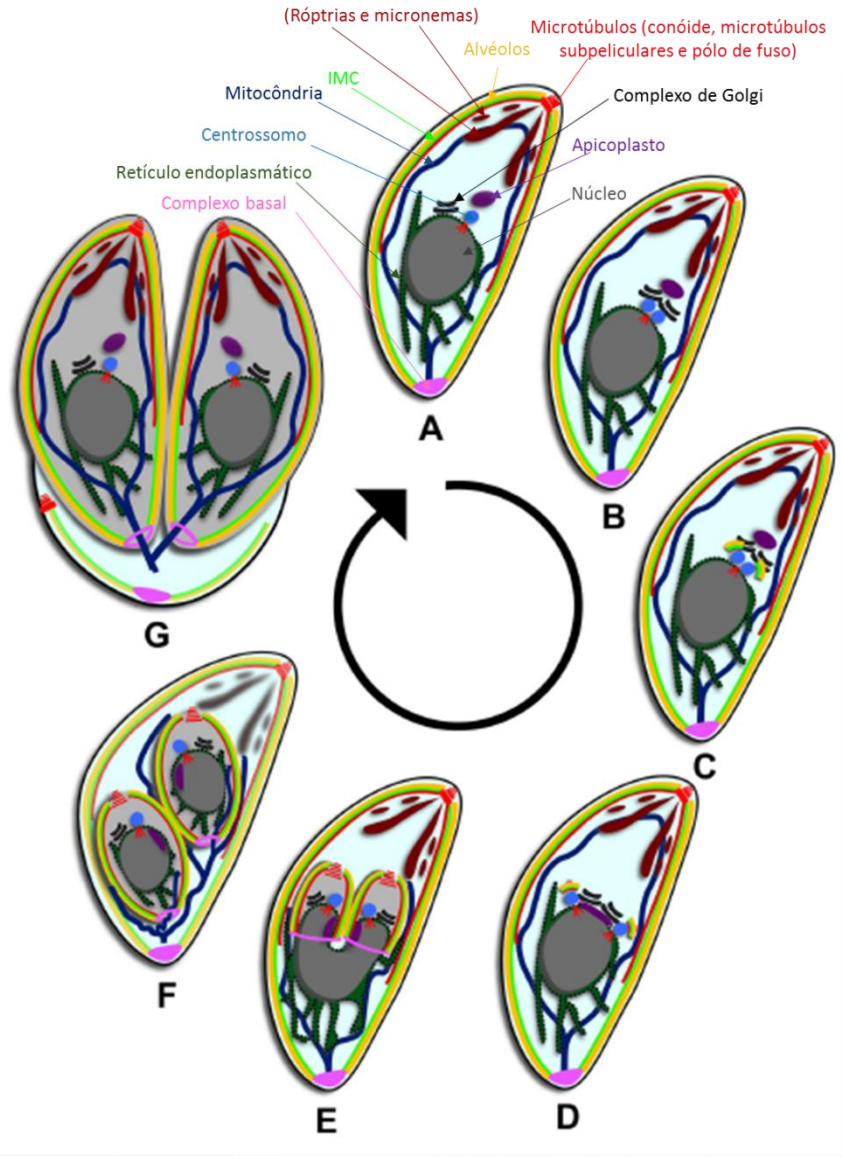


Fig. 3 - Processo de divisão de taquizoítos de *T. gondii* por endodiogenia. (A) Disposição das organelas e estruturas em um parasito maduro. (B) A divisão é iniciada com a duplicação do complexo de Golgi e dos centrossomos. (C) Posteriormente, duplicam-se os elementos de citoesqueleto: o conóide, microtúbulos subpeliculares e pólo de fuso, para divisão nuclear; (D) O pólo de fuso se duplica e o apicoplasto se move abaixo dos centrossomos, alongando-se conforme os centrossomos se separam. (E) As organelas começam a se dividir conforme as células-filhas vão se alongando e surgem dois complexos apicais (conóide, anéis polares e centro organizador de microtúbulos) que dirigem a formação do IMC; Os complexos basais das células-filhas se concentram em suas extremidades, e o núcleo já apresenta-se de forma bifurcada. (F) As células-filhas contraem-se e todas as organelas vão se dividindo, exceto a mitocôndria. As organelas secretoras (róptrias e micronemas) e o citoesqueleto da célula mãe começam a se degradar. (G) As últimas etapas da endodiogenia mostram a duplicação da mitocôndria e surgimento das organelas secretoras das células-filhas, que se separam após a incorporação da membrana plasmática da célula-mãe. A célula-mãe aos poucos se torna um corpo residual, que posteriormente se desfaz. A divisão subsequente dos parasitos continua até que a célula hospedeira seja totalmente degradada, culminando no egresso ativo do parasito e destruição da célula hospedeira infectada (Adaptado de Anderson-White *et al*., 2012).

Em organismos imunocompetentes, sob pressão do sistema imunológico do hospedeiro, os taquizoítos são diferenciados em bradizoítos, forma de multiplicação e metabolismo lento, que formam os cistos teciduais (DENKERS & GAZZINELLI, 1998). Estes cistos podem permanecer pelo resto da vida no organismo do hospedeiro sem causar nenhuma resposta inflamatória (DUBEY & FRENKEL, 1976). Porém, nos últimos anos, a infecção crônica veio ganhando importância devido à possibilidade de reativação da infecção em pacientes portadores do vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), e em pacientes imunossuprimidos em tratamento contra o câncer ou submetidos a transplante de órgãos, pois apesar do tratamento atual controlar as formas de rápida proliferação do *T. gondii*, não há nenhuma droga capaz de eliminar os cistos teciduais de animais e humanos, que se mantêm viáveis no organismo por período indeterminado (MONTAÑO *et al*. 2010). A alta probabilidade de reativação da toxoplasmose acarreta nas maiores causas de complicações e óbito para estes grupos específicos (RAMÍREZ-MACÍAS *et al*., 2012).

A infecção pelo protozoário *T. gondii* em pacientes imunocompetentes é descrita como assintomática, entretanto recentemente tem sido relacionada ao desenvolvimento de desordens neuropsiquiátricas como esquizofrenia e depressão, consequentes de danos neurológicos (HALONEN & WEISS, 2013; PANDROTA, 2014).

2.3 Organização ultraestrutural de *Toxoplasma gondii*

2.3.1 Taquizoítos

O taquizoíto de *T. gondii* é uma célula polarizada, alongada, apresentando a região anterior afilada e a região posterior arredondada. Mede aproximadamente 6 µm de comprimento por 2µm de largura. Na região apical estão localizados os anéis polares, o conóide, as róptrias e os micronemas, estruturas que formam o complexo apical (MORRISSETTE & SIBLEY, 2002), e estão relacionadas com a adesão e penetração do parasito na célula hospedeira, preparando a criação do ambiente

intracelular para o desenvolvimento do parasito (DUBEY *et al*., 1998, CARRUTHERS *et al*, 1999). O núcleo situa-se na região mediana e logo acima se encontram o complexo de Golgi e o apicoplasto. Compondo o envoltório nuclear e ramificando-se pelo citosol, estão presentes elementos do retículo endoplasmático. A mitocôndria é única e ramificada. Os grânulos densos, acidocalcissomas e grânulos de amilopectina estão presentes em número e localização variáveis. O conjunto é envolvido pela película e, abaixo desta, estão uma rede de microtúbulos subpeliculares que percorrem o corpo celular do parasita (Figura 4) (DUBEY *et al*., 1998). Os taquizoítos entram na célula hospedeira através do processo de penetração ativa ou por fagocitose, sendo no primeiro caso envolto por um vacúolo parasitóforo logo após a sua entrada (BONHOMME *et al.,* 1992; DUBEY *et al.,* 1998).

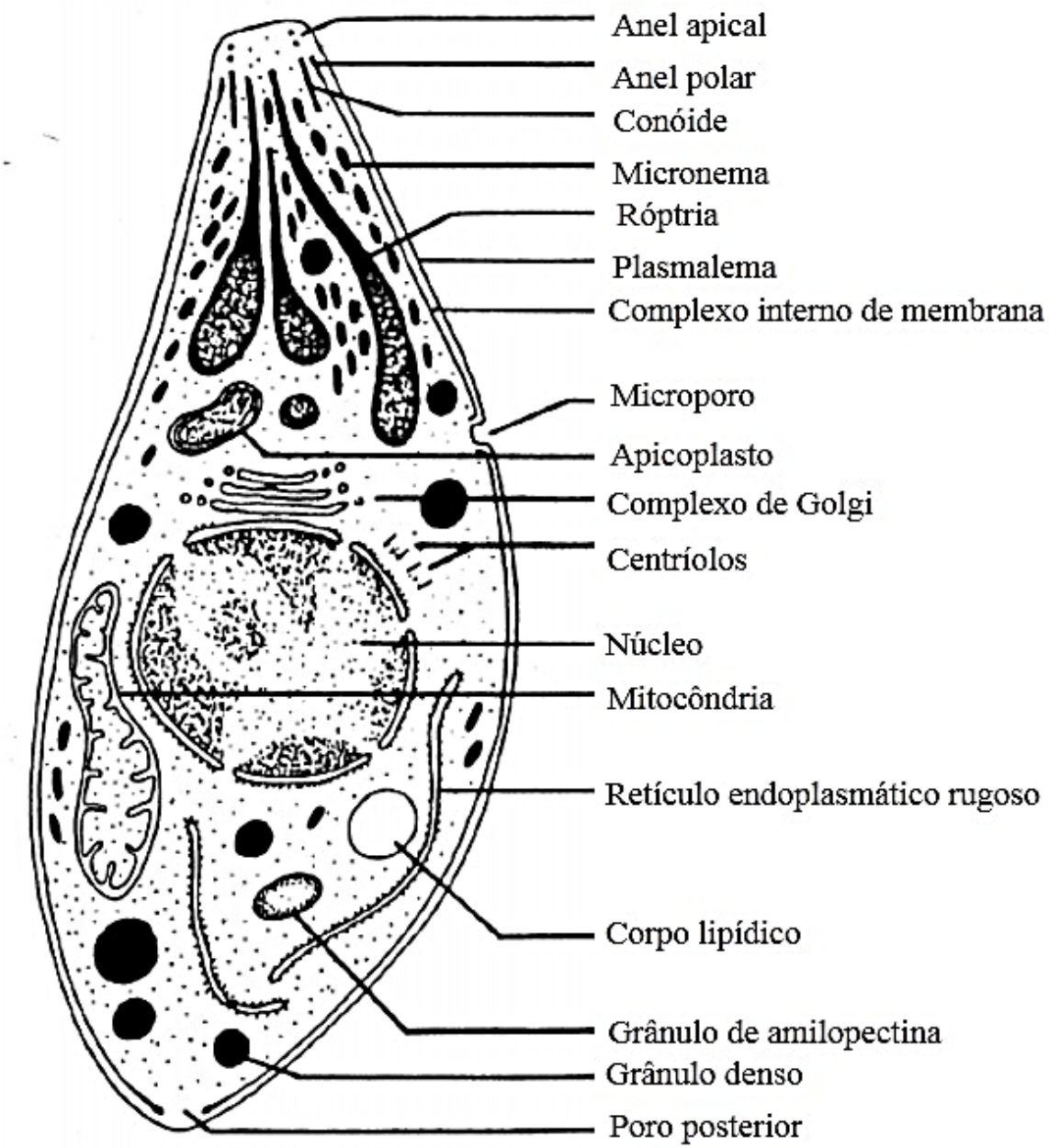


Fig. 4 - **Representação da ultraestrutura da forma taquizoíto de *Toxoplasma gondii.*** A forma taquizoíto de *T. gondii* apresenta as organelas listadas estando o núcleo centralizado e tendo poucos grânulos de amilopectina, que geralmente estão ausentes nesta forma. Traduzido de Dubey *et al.* (1998).

2.3.2 Bradizoítos

Bradizoítos presentes nos cistos teciduais medem cerca de 7 µm de comprimento por 1,5 µm de largura. O núcleo encontra-se deslocado para a parte posterior do corpo do parasita (DUBEY *et al*., 1998; WEISS & KIM, 2000). Grânulos de amilopectina são achados em grande quantidade em seu citoplasma (Coppin *et al*., 2003), enquanto são raros ou inexistentes em taquizoítos (DUBEY *et al*., 1998). Estes grânulos são estruturas compostas de cadeias de glicose que servem como reserva energética às formas evolutivas como bradizoítos e esporozoítos (COPPIN *et al*., 2005) (Figura 5). Os bradizoítos se encontram dentro dos cistos teciduais (WEISS & KIM, 2007). A parede cística tem como principal característica manter a integridade dos cistos que permanecem por tempo indeterminado nas células hospedeiras (DUBEY *et al*., 1997). O tamanho do cisto tecidual pode apresentar variações, cistos jovens podem ter 5 µm e poucos bradizoítos em seu interior enquanto cistos maduros, ultrapassam 70 um de diâmetro e podem possuir centenas de bradizoítos em seu interior (DUBEY et al., 1998).

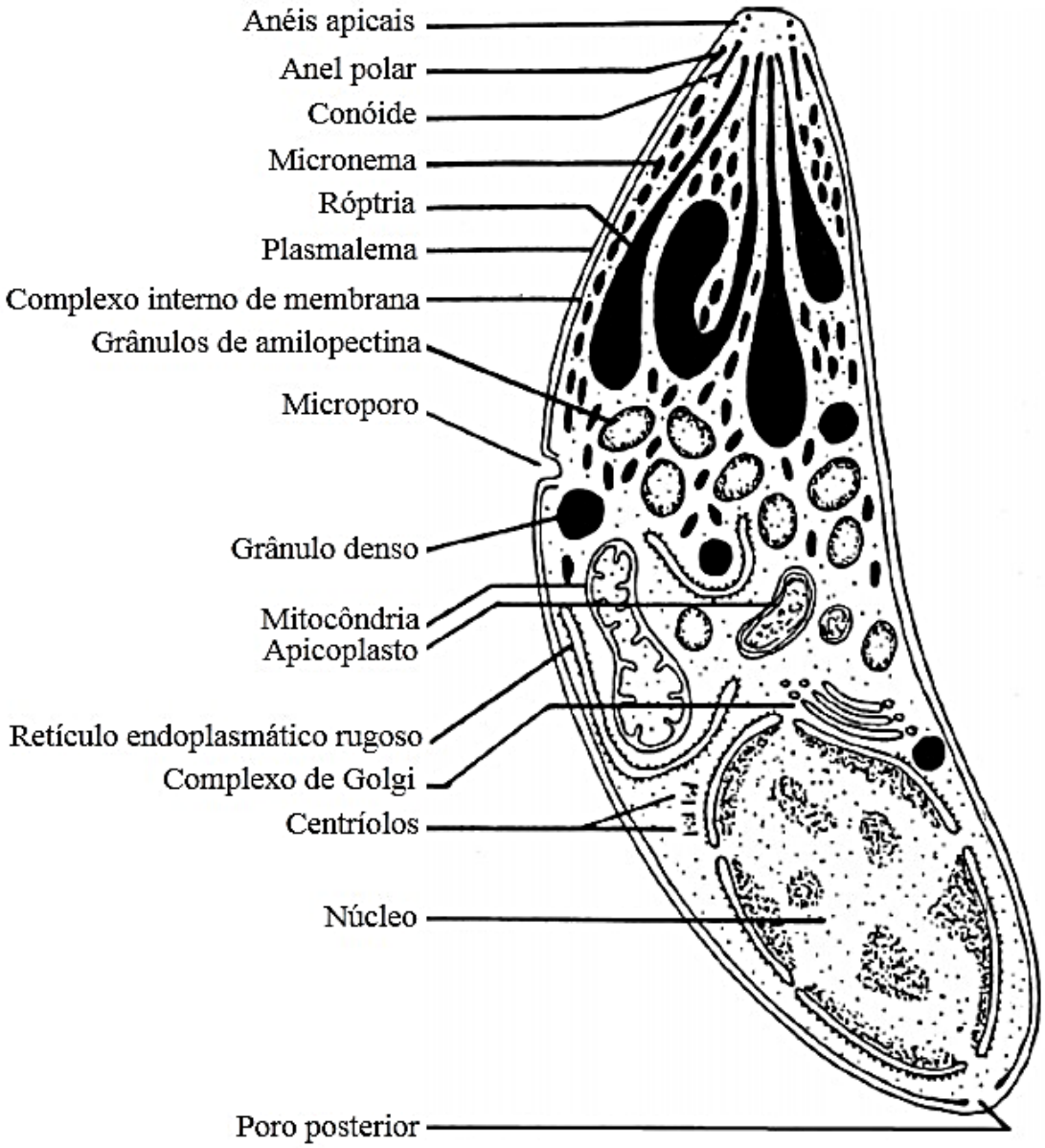


Fig. 5 - Representação da ultraestrutura da forma bradizoíto de *Toxoplasma gondii.* A forma bradizoíto de *T. gondii* possui as organelas listadas acima, com a presença marcante de grânulos de amilopectinas que são característicos desta forma do parasito e núcleo na região posterior. Traduzido de Dubey *et al.* (1998).

2.4 Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, o agente etiológico da toxoplasmose é o protozoário intracelular obrigatório *T. gondii* (TENTER *et al*., 2000). A toxoplasmose é considerada cosmopolita e infecta animais de estimação e produção como suínos, caprinos, aves, animais silvestres, gatos e a maioria dos vertebrados terrestres homeotérmicos, incluindo os seres humanos (LYONS & JOHNSON, 1995). A taxa média de contaminação em populações humanas varia de 30 % a 95% dependendo da região, isso vai depender dos costumes alimentares e condições de higiene desses locais (INNES, 2010). A prevalência da toxoplasmose se dá em países tropicais e sua disseminação está relacionada aos hábitos de vida locais (Campos *et al.,* 2014), no Brasil o predomínio da doença varia entre 50% e 80% (BONFIOLI; OREFICE, 2005). Em indivíduos imunocompetentes, a infecção com *T. gondii* é constantemente assintomática. Porém, indivíduos imunocomprometidos*,* como portadores do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), pacientes transplantados e gestantes que podem transmitir a infecção congenitamente, são os mais susceptíveis à infecção pelo parasito, gerando sintomas graves como, por exemplo, encefalites, cefaleia, desorientação, letargia, hemiparesia, alterações de reflexos, convulsões, pneumonia e miocardite (MCAULEY *et al*., 1994). Em infecções congênitas, além de potencial para gerar abortos espontâneos, a toxoplasmose pode acarretar no nascimento de fetos malformados, sendo capaz de danificar o cérebro e a retina, resultando em graves consequências, dentre elas a inflamação da retina (coriorretinite). Podem ocorrer em alguns casos retardamento mental, calcificações intracranianas e hidrocefalia (MCAULEY *et al*., 1994).

A transmissão da toxoplasmose adquirida em humanos se dá pela ingestão de água ou comida contaminada, oocistos esporulados presentes no meio ambiente, consumo de carne crua ou malcozida de hospedeiros intermediários com a presença de cistos teciduais e congenitamente, especialmente quando a mãe adquire a infecção pela primeira vez no período gestacional (LIU *et al* 2015).

2.4.1 Epidemiologia

O Brasil é um país extenso, existindo cerca de mais de 190 milhões de habitantes (DUBEY *et al.,* 2012). Em 2012 infecções causadas por microorganismos patogênicos como, por exemplo: fungos, bactérias, vírus ou parasitos foram responsáveis por aproximadamente 17% do total da taxa de mortalidade humana mundial (WHO 2012). A toxoplasmose se enquadra dentro dessa classificação, sendo esta cosmopolita, mas, com diferentes índices epidemiológicos. As menores taxas de infecção (10% a 30%) são descritas na América do Norte, Sudeste da Ásia, Norte da Europa e alguns países do continente africano. Taxas medianas de infecção (30% a 50%) são encontradas em países centrais e do sul da Europa, e altas taxas são relatadas em países da América Latina e América do Sul (ROBERT-GANGNEAUX & DARDÉ, 2012).

No sul do Brasil a soropositividade para *T. gondii* chega em torno de 80%, sendo a mais importante via de transmissão o consumo de carne suína, podendo levar ao desenvolvimento de toxoplasmose ocular em parte da população infectada. (JONES *et al*., 2006). Em campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro, a prevalência sorológica para *T gondii* já chegou a 84%, decorrente de um surto por contaminação de oocistos através de água de reservatórios (BAHIA-OLIVEIRA *et al*., 2003). A água contaminada tem sido um fator importante em contaminações causadas por surtos (BENENSON *et al*., 1982 BOWIE *et al*., 1997).

Dados epidemiológicos apontam a infecção pelo parasito em mulheres varia mundialmente desde 10.9% (Noruega) até 90% (na França e Taiti) e no Brasil, cerca de 70% das gestantes apresentam soropositividade para toxoplasmose (PAPPAS *et al* 2009). Esta alta incidência em gestantesm gera como consequência cerca de 3.000 nascimentos anuais de crianças portadoras de alguma síndrome causada pela toxoplasmose congênita: danos oculares, deficiência neurológica ou danos auditivos (DUBEY et al.,2012). Este fato destaca a importância do estudo da toxoplasmose, visto que existe grande prevalência mundial da toxoplasmose e essa doença afeta a saúde pública de maneira significativa.

2.5 Tratamento

O tratamento atual da toxoplasmose baseia-se na utilização de fármacos com ação parasito-estática, eficazes em impedir a proliferação dos parasitos. Porém esses fármacos não são ativos contra os resistentes cistos teciduais, sendo ativos somente contra taquizoítos, que caracteriza a fase aguda da toxoplasmose (Milewska-Bobula *et al*., 2015). Os fármacos utilizados para o tratamento da toxoplasmose são a combinação de pirimetamina e sulfadiazina, que inibe a síntese e a redução de ácido fólico em taquizoítos (MONTOYA *et al*, 2005). Ambos os fármacos entram no fluído-cérebro espinhal e altas doses utilizadas durante o tratamento levam a toxicidade. Desse modo, o tratamento está associado a muitas reações adversas como, por exemplo, a supressão medular (HAVERKOS H.W., 1987 *apud* DE SOUZA, W., 2006).

A Pirimetamina é uma droga antimalárica usada no tratamento da toxoplasmose juntamente com sulfadiazina. Este fármaco é capaz de interromper o ciclo metabólico do parasita, atuando na inibição da enzimadiidrofolato-redutase que produz ácido fólico, sendo este necessário para a síntese de DNA e RNA, do parasita. O uso de pirimetamina não é indicado no primeiro trimestre da gestação, pois tem efeito teratogênico (ANDERSON & MORSE, 1966). Sua administração em doses excessivas pode provocar efeitos colaterais como: vômitos, tremores, convulsões e depressão da medula óssea (REMINGTON *et al*., 2001).

A sulfadiazina está dentro do grupo das sulfonamidas, sendo análogas estruturalmente e antagonistas competitivas do ácido paraminobenzóico (PABA), que é utilizado pelos parasitos na síntese de ácido folíco. A combinação da sulfadiazina com a pirimetamina é utilizada no tratamento das infecções causadas pelo *T.gondii,* a combinação desses dois fármacos aumenta a atividade da pirimetamina em até oito vezes (EYLES & COLEMAN, 1955; SHEFFIELD *et al*., 1972). No entanto, não é indicada a administração da sulfadiazina no final do terceiro trimestre da gestação (REMINGTON *et al*., 2001), além de estarem ligadas a abortos espontâneos podem deslocar a bilirrubina fetal circulante de sua ligação com a albumina provocando seu deslocamento para o SNC, resultando em Kernicterus, uma síndrome que está associada com hiperbilirrubinemia que tem como efeitos, retardo mental, paralisia

cerebral, surdez e a paralisia nos olhos. (Peters *et al*., 2007). A sulfadiazina também está relacionada com problemas renais e formação de cristais na urina (WHO, 1999).

A sulfadiazina é uma substância não muito tolerada, podendo ser substituída por outros fármacos como, por exemplo, a clindamicina. A combinação pirimetamina-clindamicina é tão eficaz quanto pirimetamina-sulfadiazina durante a fase aguda da doença (Dannemann *et al*., 1992; Katlama *et al*., 1996).

O folinato de cálcio ajuda a minimizar os efeitos causados por medicamentos antifolato como a pirimetamina-sulfadiazina, pois é utilizado pelo paciente a fim de prevenir problemas hematológicos consequentes do uso de medicamentos antifolatos (Frenkel & Hitchings, 1957; Frenkel *et al*., 1960).

Para o tratamento em gestantes com toxoplasmose aguda é utilizada a espiramicina (GARIN & EYLES, 1968; NIEL *et al*., 1981), pois este fármaco contrariamente dos antifolatos, não apresenta efeito teratogênico e por isso é indicado para gestantes com toxoplasmose na fase aguda diminuindo a transmissão vertical (da mãe para o feto). A espiramicina é um antibiótico macrolídeo que atua inibindo a síntese proteica em microorganismos (JOHNSTON, 2006). No entanto, a ação da espiramicina contra o parasito é considerada menos eficaz (NATH & SINAI, 2003). Doses altas (35 mg/kg) de espiramicina provocam diversos efeitos colaterais como, vaso espasmo, calafrios, vertigem, hiperemia da face, náusea, vômitos, diarréia, anorexia e arritmias cardíacas (STRAMBA-BADIALE *et al*., 1997). Não existem estudos que comprovem a eficácia deste medicamento no tratamento de fetos infectados (FORESTIER *et al*., 1987), porém a espiramicina reduz a severidade da infecção fetal, principalmente por retardar o período em que ocorre a transmissão placentário-fetal, dando ao feto tempo para adquirir maior maturidade imunológica (COUVREUR *et al*., 1998*).*

O quadro a seguir mostra os fármacos utilizados no tratamento atual da toxoplasmose, assim como seus respectivos mecanismos de ação e efeitos colaterais:

Quadro 1. Fármacos utilizados no tratamento vigente da toxoplasmose

FÁRMACOS	MECANISMO DE AÇÃO	EFEITOS COLATERAIS	REFERÊNCIAS
Pirimetamina + Sulfadiazina	Medicamentos antifolato, afetam a replicação do parasito	Supressão medular, efeitos hematológicos e teratogênese	Haverkos, 1987
Pirimetamina	Inibidor da enzima diidrolato redutase, interfere na síntese de folinato de cálcio	Vômitos, tremores, convulsões e supressão medular, teratogênese e efeitos hematológicos	Anderson & Morse, 1996; Ramington *et al*., 2001;
Sulfadiazina	Antagonista do ácido PABA (crucial na síntese de ácido fólico)	Deslocamento de bilirrubina fetal e desenvolvimento da síndrome Kernicterus pelo feto	Eyles & Coleman, 1995; Sheffield *et al*., 1972;
			Dannemann *et al*., 1992; Katlama *et al*.,

Clindamicina	Age no apicoplasto do parasito, inibindo a síntese proteica	Colite ulcerativa	1996; Dubey 2010; Campos *et al*., 2002 ;
Espiramicina	Antibiótico macrolídeo/ inibe a síntese proteica	Calafrios, vasoespasmo, vertigem, náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, arritimais cardíacas	Niel *et al*., 1981; Garin *et al*., 1968; Stramba-Badiale *et al*., 1997; Johnston 2006;
Folinato de Cálcio	Reduz os efeitos colaterais dos medicamentos antifolatos	-	Frenkel & Hitchings, 1957; Frenkel *et al*., 1960.

Considerando os efeitos adversos provocados pelas drogas utilizadas para tratar a toxoplasmose (descritos acima), é sabido que a terapia proposta atualmente não é totalmente eficaz, consequentemente o estudo de novas terapias mais eficientes e com menos reações adversas tornam-se necessárias.

2.6 Compostos metalocomplexos

Os metais vêm sendo usados na medicina desde tempos remotos, mesmo sem o conhecimento sobre seus mecanismos de ação, toxicidade ou qualquer propriedade química dos compostos (SCHWIETERT *et al*., 1999). Existem relatos descritos na literatura sobre a utilização de sais de mercúrio, sendo este utilizado para o tratamento de infecções no século X e no século XVI foi utilizado para o tratamento da epidemia de sífilis (VILELA-RIBEIRO *et al*., 2011).

As atividades biológicas praticadas por metais têm incitado o desenvolvimento de fármacos à base de metais, apesar dos metais serem utilizados para fins terapêuticos desde muito tempo, Rosenberg e colaborados em 1965, descobriram a atividade antitumoral do complexo conhecido como cisplatina, essa descoberta despertou um grande interesse por complexos metálicos com propriedades farmacológicas (ORVIG & ABRAMS, 1999; FONTES *et al*., 2005).

Novos compostos inorgânicos vêm sendo estudados, a fim de melhorar a eficiência no combate da infecção contra a toxoplasmose, estes compostos estudados têm apresentado interessantes propriedades e efeitos biológicos e são conhecidos como compostos metalocomplexos.

A literatura descreve que moléculas ativas biologicamente quando coordenadas a metais podem originar complexos mais potentes. Os metais, em particular metais de transição, apresentam diversas atividades e vantagens sobre os fármacos mais comuns, baseados em compostos orgânicos (VAN RIJT & SADLER, 2009). Os metais por seres bons aceptores de elétrons conseguem interagir e coordenar-se com moléculas ricas em elétrons, como por exemplo, as proteínas e o DNA (ORVIG & ABRAMS, 1999). A capacidade de troca do ligante permite o metal interagir e coordenar-se com diferentes moléculas biológicas, aumentando assim a lipofilicidade do fármaco, após sua coordenação com o metal, facilitando a passagem do composto através das membranas biológicas (AHMAD *et al*., 2006; BRUIJNINCX & SADLER, 2008). Para reversão de perfis de resistência de célula-alvo a determinados fármacos pesquisadores utilizaram estrategicamente a adição de

metais a estas moléculas (TAN *et al*., 2000; WRIGHT & SUTLHERLAND, 2007). De acordo com FONTES *et al* 2005, compostos metálicos coordenados a antibióticos são em geral mais potentes que o fármaco não coordenado. Complexos do antibiótico tetraciclina e o metal paládio testados contra linhagens resistentes de *Escherichia coli*, foram dezesseis vezes mais potentes que o antibiótico livre (Guerra *et al*., 2005) assim como, os complexos platina e paládio quando coordenados a dioxiciclina e tetraciclina, foram tóxicos para células leucêmicas mostrando maior atividade que os antibióticos não coordenados (PAULA *et al*., 2008; SILVA *et al*., 2010).

Estudos descritos na literatura mostraram que a coordenação de compostos pode ser uma alternativa interessante para terapia antiparasitária. Tem sido estudado o efeito biológico de compostos metalocomplexos, alguns metalocomplexos como o novo metalocomplexo μ-oxo di-ferro funcionam como nucleases e peptidases sintéticas, sendo úteis na manipulação de DNA. (PARRILHA *et al*., 2008). Complexos ferro (III), cobalto (II), cobre (II) e zinco (II) apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus*. (FERNANDES *et al*., 2010).

Compostos metalocomplexos apresentam interessantes atividades biológicas como fungicida, bactericida e antiviral (SINGH *et al*., 2000; NATH *et al*., 2001). Compostos a base de íons cobre ou cobalto ligados ao ligante HmtpO, onde HmtpO é {5-metil-1,2,4-triazol [1,5-a] pirimidina-7 (4H)-um}, atinge vigorosamente o metabolismo energético de *Leishmania infantum* e *L. braziliensis* alterando a estrutura de membrana, organelas e induz morte celular (RAMIREZ-MACIAS *et al*., 2012). Horn *et al*. (2005) mostraram que o ligante HPClNOL [1-(bis-piridina-2-ylmetil-amino)-3-cloropropano-2-ol] apresentou interessantes atividades quando associados a complexos de ferro e cobre. O complexo de cobre [Cu(HPClNOL)Cl] apresentou atividade de nuclease, sendo ativo contra células leucêmicas (Fernandes *et al*., 2006). E quando associado ao ferro, notou-se que o composto mononuclear [Fe(HPClNOL)(Cl)2] foi capaz de preservar *Saccharomyces cerevisiae* do estresse oxidativo, mimetizando superóxido dismutase e catalase (HORN Jr *et al*., 2010). As atividades desses compostos contra célula cancerígena foram modestas e associada à baixa toxicidade ás células normais do organismo (HORN Jr. *et al*., 2013). Tais fatos impulsionaram a realização dos testes com o composto metalocomplexo N4013.1 em

células fibroblásticas LLC-MK2 infectadas com o *T. gondii,* visto que o principal fator da terapia antiparasitária atual é não preservar a viabilidade da célula hospedeira.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito anti-*Toxoplasma gondii* de um novo composto metalocomplexo com núcleo de ferro coordenado à sulfadiazina estudando seus possíveis mecanismos de ação.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar o efeito do composto metalocomplexo coordenado à sulfadiazina sobre taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH, mantidos em células $LLCMK_2$ em diferentes tempos do seu ciclo celular por microscopia óptica.

3.2.2 Avaliar a ultraestrutura do *T. gondii* após o tratamento com o composto através de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

3.3.3 Verificar se o tratamento com o composto induz à conversão de taquizoítos a bradizoítos de *T. gondii* e à formação de parede cística, utilizando microscopia de fluorescência.

3.3.4 Avaliar se após o tratamento com o composto o parasito sofre morte celular por autofagia, utilizando marcador específico revelado por microscopia de fluorescência.

4 METODOLOGIA

4.1 Manutenção dos parasitos

4.1.1 Taquizoítos (Cepa RH)

Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (Cepa RH) foram mantidos por passagens intraperitoneais em camundongos suíços (CF-1) de 21 dias de idade. 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), para a retirada das células e restos celulares peritoneais e o sobrenadante coletado era novamente centrifugado (1000g; 10'; 4°C) para a obtenção das formas taquizoítos. Os parasitos contidos no pellet foram ressuspensos em meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*) e a quantidade de parasito foi quantificada através da câmara de Neubauer ao microscópio óptico convencional Axioplan – ZEISS.

O uso de camundongos para passagens de taquizítos de *T. gondii*, permitindo a execução deste trabalho, foi aprovada pela Comissão de Ética de Uso de animais (CEUA) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (código: IBCCF99).

4.1.2 Cultivo da célula hospedeira LLC-MK2

Células epiteliais de rim de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*), LLC-MK2 (ATCC CCL,7 Rockville, MD/EUA) foram cultivadas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%, e mantidas em estufa de CO_2 a 37ºC. As células multiplicavam-se até a formação de monocamada aderente à superfície do frasco de cultura. A subcultura dessas células foi obtida a partir de culturas confluentes,

enquanto a infecção com o parasito era realizada em culturas subconfluentes. As células eram subcultivadas, a partir de suspensões celulares obtidas por tripsinização de células em monocamada. No dia anterior ao experimento as células eram plaqueadas em placas de 24 poços, contendo lamínulas de vidro.

4.2 Composto metalocomplexo

O composto metalocomplexo sob o código N4013.1(p.m: 1.292,19g), que consiste na molécula de sulfadiazina coordenada ao metalocomplexo de ferro N4913, foi sintetizado e gentilmente cedido pelo professor Dr. Adolfo Horn Jr. e colaboradores do Laboratório de Ciências Químicas da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

Para estudos *in vitro*, o composto N4013.1 foi diluído em Dimetil sulfóxido (DMSO; Merck) puro e adicionado diretamente ao meio de cultura. A concentração final de DMSO no meio nunca excedeu 0.01% (v/v) e este não teve efeito na proliferação de parasitos intracelulares e das células hospedeiras. O controle foi feito com uso da maior concentração de DMSO sem a adição dos compostos. O composto foi estocado a -22°C. A sulfadizina (SDZ) (p.m: 250,28g) (Sigma), utilizada como controle positivo dos experimentos, foi diluída em água destilada e mantida a -22ºC.

4.3 Interação parasito-célula hospedeira

As células foram infectadas com parasitos recém-coletados dos camundongos infectados dois dias antes do experimento e ressuspensos em meio RPMI na proporção de 5:1 parasitos por célula hospedeira, para verificação dos efeitos antiproliferativos e 10:1 para o experimento de microscopia eletrônica de transmissão.

Para que houvesse a interação, a placa foi mantida por 1 hora em estufa com 5% de CO2 a 37°C. Após esta etapa as células foram lavadas com PBS para retirada de parasitos extracelulares não aderidos. O composto e a sulfadiazina foram diluídos em meio de cultura RPMI e suplementado com 5% de SFB para a obtenção das diferentes concentrações de 2,5 µM, 5,0 µM, 10 µM, 20 µM e 30 µM utilizadas nos experimentos *in vitro*. Os controles receberam meio de cultura RPMI suplementado com 5% de SFB. A placa foi incubada por 48h em estufa com 5% de CO2 a 37°C, para os ensaios de curvas de crescimento e obtenção do IC50 dos compostos.

4.4 Microscopia óptica

Após 48 horas de interação, as células foram fixadas com 4% de formaldeído nascente em PBS, coradas com corante Giemsa 10% em água destilada, desidratadas em diferentes concentrações de acetona-xilol. Após a desidratação as lamínulas foram montadas sobre gotas de Entellan. As lâminas prontas foram observadas ao microscópio óptico Axioplan – ZEISS e também ao microscópio Axio Imager – ZEISS para obtenção de imagens destas interações e análise da distribuição dos parasitos no interior da célula hospedeira.

4.5 Ensaio antiprolifetarivo

Foi realizada a contagem para o cálculo do Índice de infecção e realização das análises estatísticas.

A multiplicação do parasito pode ser analisada de dois modos: 1) através do número de parasitos em 100 células infectadas em duplicata de cada condição do

experimento; ou 2) através do cálculo do índice de infecção (I.I) (quadro 1). Para a determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento dos parasitas (IC50), aplicaram-se os valores do I.I obtidos.

Desta forma, a porcentagem de inibição do crescimento foi plotada como uma função da concentração do composto ajustando os valores.

Quadro 1. ***Fórmula para o cálculo de Índice de Infecção (I.I):***

(I.I) = % células infectadas (nº parasitas intracelulares/ nº total de células infectadas)

4.6 Citotoxicidade do composto metalocomplexo contra a célula hospedeira

4.6.1 Ensaio de viabilidade celular

O efeito tóxico do composto N4013.1 a células hospedeira foi avaliado com base na redução de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium. MTS é bioreduzido por células vivas ao produto formazan, que é solúvel em meio de cultura (Riss *et al*., 1992). Para esse ensaio, 10^3 células poço foram plaqueadas em placas de 96 poços e cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB, com um volume final de 100 µL/poço. Após 24 h, as células foram lavadas e submetidas ao tratamento com o composto N4013.1 a diferentes concentrações em meio RPMI suplementado com 5% de SFB durante 48 horas. As concentrações variaram de 75 a 6,25 µmol L^{-1}. Como controle negativo, ás células foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 5% de SFB sem adição do composto. Como controle positivo, as células foram diretamente sujeitas a 10% de

Triton X-100 em meio RPMI sem SFB e foram cultivadas como descrito anteriormente. O volume final de cada poço foi de 100 µl. Após 48 h de tratamento, as células de cada poço receberam 20 µl de MTS (concentração final de 0.33 mg/ml) e a placa foi incubada por 4 horas (37°C, 5% CO_2), sob proteção da luz. A leitura da absorbância do produto formazan foi feita no comprimento de onda de 490nm em leitor de microplaca Versamax (Molecular Devices).

4.7 Microscopia eletrônica de transmissão

Para observar a ultraestrutura de parasitos intracelulares, as células não tratadas e as tratadas com o composto durante 48h, foram fixadas em solução contendo 2.5% de glutaraldeído e 4% de formaldeído nascente em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.4. Posteriormente as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0.1 M e pós-fixadas por 40 minutos no escuro em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.4. Em seguida, as células foram lavadas no mesmo tampão, desidratadas em concentrações crescentes de acetona (de 30% a 100%) e embebidas em resina epóxi. Secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI SPIRIT 120 K volts.

4.8 Imunofluorescência e ensaios para detecção de morte celular do *T. gondii*

Células LLC-MK2 foram infectadas com taquizoítos, tratadas ou não com o composto a 10 µM, por 48 horas, lavadas com PBS e fixadas com 4% de formaldeído nascente em tampão PHEM (60 mM Pipes, 20 mM Hepes, 10 mM EGTA, 5 mM MgCl2, e 70 mM KCl, pH 7.2). Após fixação, as lamínulas foram lavadas, permeabilizadas com 5% de Triton X-100 em tampão PHEM, e incubadas com 50 mM de Cloreto de Amônio (NH_4Cl) por 30 minutos, em seguida com Soro Albumina Bovina (Sigma) 3% em tampão PHEM (PHEM-BSA) por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação com os bloqueios, as células foram incubadas por 1 hora com lectina de *Dolichos biflorus* conjugada a fluoresceína (DBA-FITC) (10 µg/ml) (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) ou com anticorpo policlonal de coelho *light chain B3* (LC3B) (diluição 1:1000) posteriormente, as células marcadas com LC3B foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexa 546 (diluição 1:100) (Molecular Probes). Após marcação, as lamínulas foram montadas com o reagente “ProLong Gold® antifade” (Invitrogen) para análise ao Microscópio óptico de fluorescência.

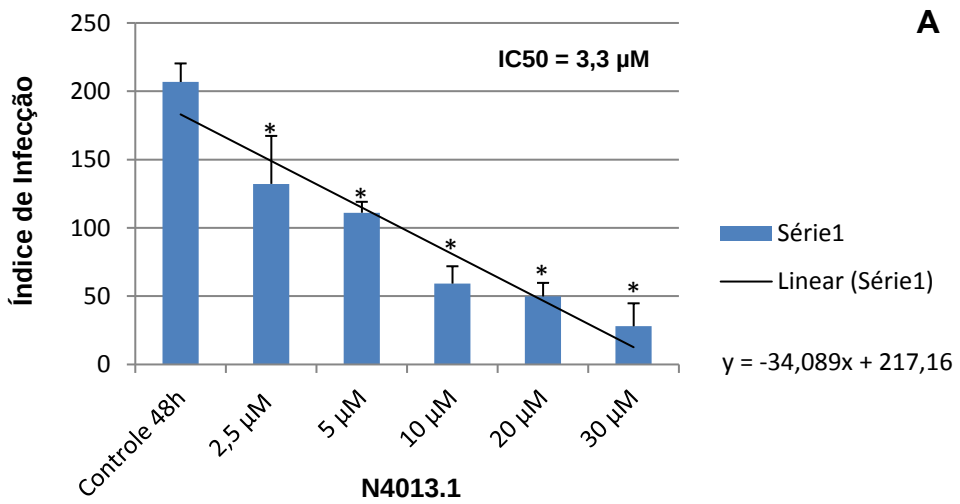
4.9 Análise dos dados

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o teste *t* de Student e análise de variância (ANOVA) para comparação de valores, sendo $P < 0,05$ considerado significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Cálculo para determinação do IC50 do composto N4013.1 e sulfadiazina.

A ação anti-*Toxoplasma* do composto N4013.1 e sulfadiazina contra taquizoítos intracelulares de *T. gondii* mantidos em células LLC-MK2 foi analisada após 48h. A Figura 6 demonstra que o índice de infecção em células não tratadas (controle), foi crescente em relação às células tratadas com diferentes concentrações da sulfadiazina e do composto N4013.1. Células tratadas com o composto N4013.1 apresentou IC50 na faixa de 3.3 µM enquanto células tratadas com sulfadiazina apresentou IC50 na faixa de 4.6 µM (Figura 6. A e B).



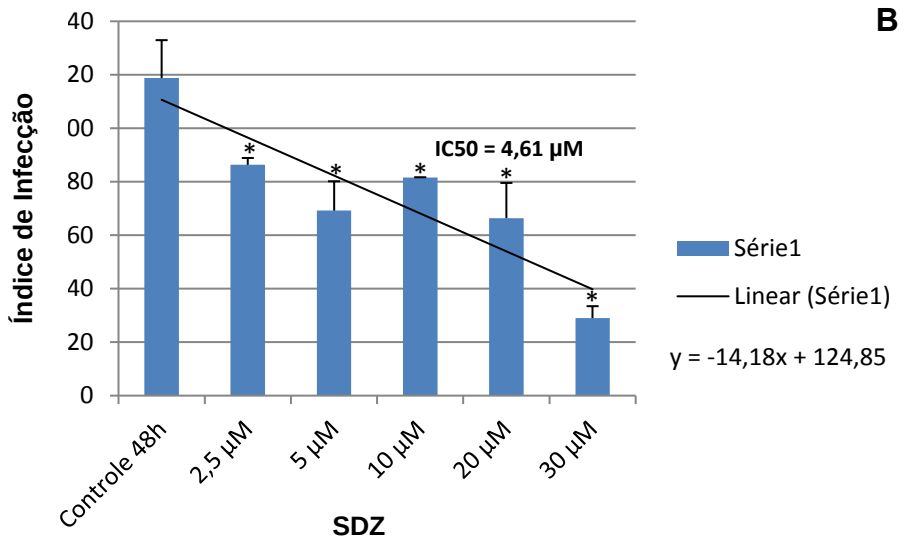


Fig. 6 - Índice de infecção (I.I) das interações de *Toxoplasma gondii* com células LLCMK2 tratadas por 48h com sulfadiazina e o composto metalocomplexo N4013.1 para determinação do IC50. (A) Crescimento do parasito *T. gondii* em células LLC-MK2 após tratamento de 48h com diferentes concentrações do composto N4013.1. (B) Crescimento do parasito *T. gondii* em células LLC-MK2 após tratamento de 48h com diferentes concentrações da sulfadiazina.

5.2 Quantificação de parede cística de *T. gondii* tratados ou não com o composto N4013.1 e Sulfadiazina após interação com células LLC-MK2.

O aparecimento de bradizoítos foi comprovado após marcação das células com lectina DBA, que se liga de forma específica a parede dos cistos de bradizoítos (zhang *et al,* 2001). Enquanto não foi detectado marcação de DBA em células não tratadas (controle), em células tratadas com sulfadiazina e com o composto N4013.1 foram encontrados alguns vacúolos parasitóforos marcados com DBA. A contagem apontou que em torno de 1,75 % das células infectadas e tratadas com sulfadiazina apresentaram marcação positiva para DBA, assim como, aproximadamente 2,3% dos vacúolos das células tratadas com o composto N4013.1 apresentaram marcação positiva (Figura 7).

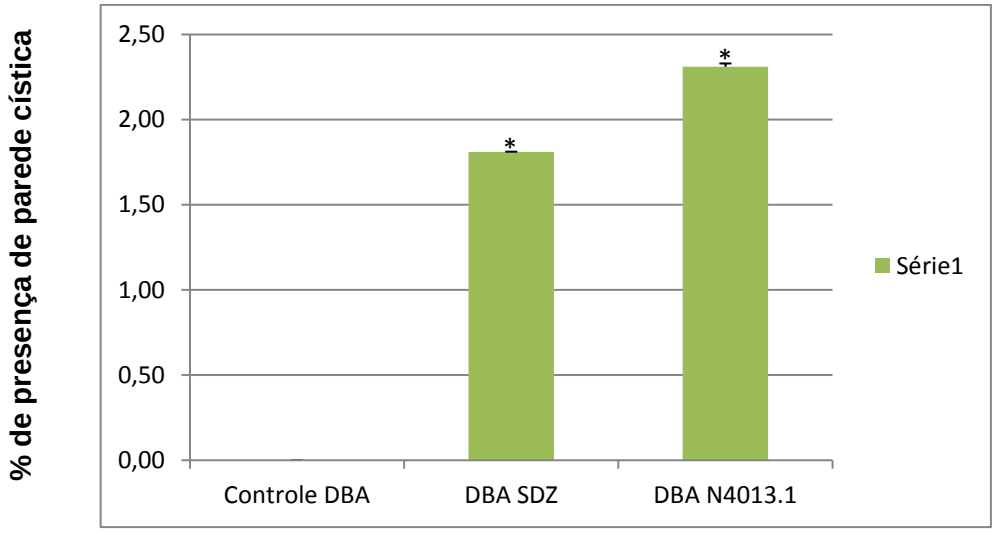


Fig 7. Quantificação da presença de cistos de *T. gondii* em células LLC-MK2 tratadas ou não com o composto N4013.1 e sulfadiazina por 48 h. Nota-se que células não tratadas com o composto (controle) não apresentam cistos. Células tratadas com o composto N4013.1 e sulfadiazina por 48 h, apresentam baixo índice de cistogênese.

5.3 Quantificação de morte celular por autofagia de *T. gondii* tratados ou não com o composto N4013.1 e Sulfadiazina após interação com células LLC-MK2.

Após 48 h de tratamento com 10 µM de sulfadiazina e do composto N4013.1, alguns parasitos foram positivos para LC3B que marca vesículas autofágicas. Em células não tratadas (controle) a marcação para LC3B foi ausente, assim como, as células tratadas com sulfadiazina. Em células tratadas com o composto N4013.1 a marcação para LC3B foi muito baixa. Os parasitos marcados foram quantificados e apenas 0,01% de parasitos foram positivos para LC3B após o tratamento (Figura 8).

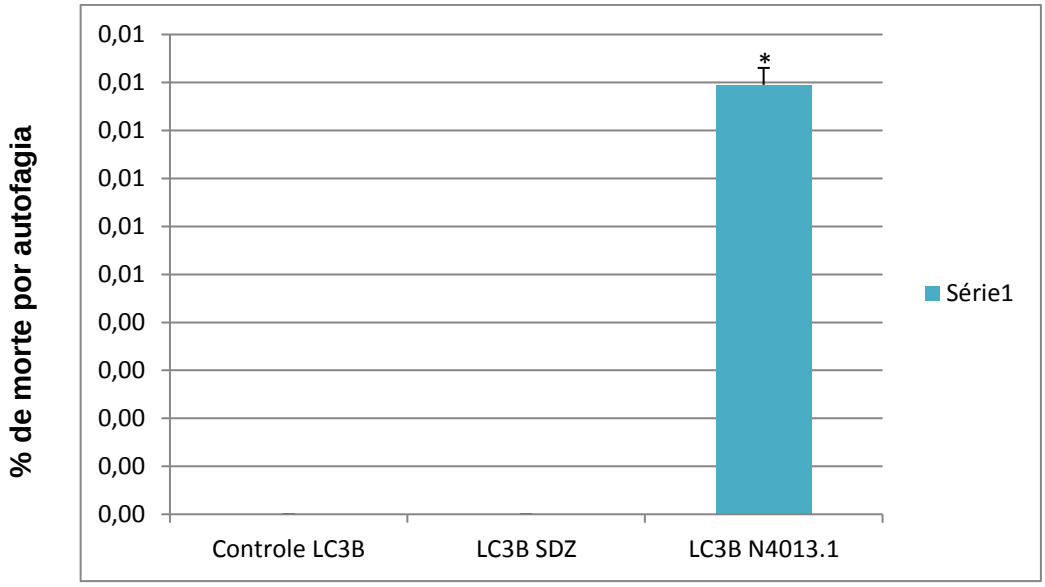


Fig. 8 - Quantificação de morte por autofagia de *T. gondii* em células LLC-MK2 tratadas ou não com o composto N4013.1 e sulfadiazina por 48 h. Nota-se que células não tratadas com o composto (controle) e tratadas com sdz não apresentaram morte por autofagia. Células submetidas ao tratamentocom o composto N4013.1 por 48 h, apresentaram % baixo para morte por autofagia.

5.4 Viabilidade das células hospedeiras após o tratamento com o composto N4013.1 em diferentes concentrações.

A toxicidade do composto N4013.1 para a célula hospedeira (LLC-MK2) foi avaliada após 48h de tratamento. A figura 9 mostra que esse composto não afeta a viabilidade das células hospedeiras (ensaio MTS) após 48 h, em concentrações até 100 µM.

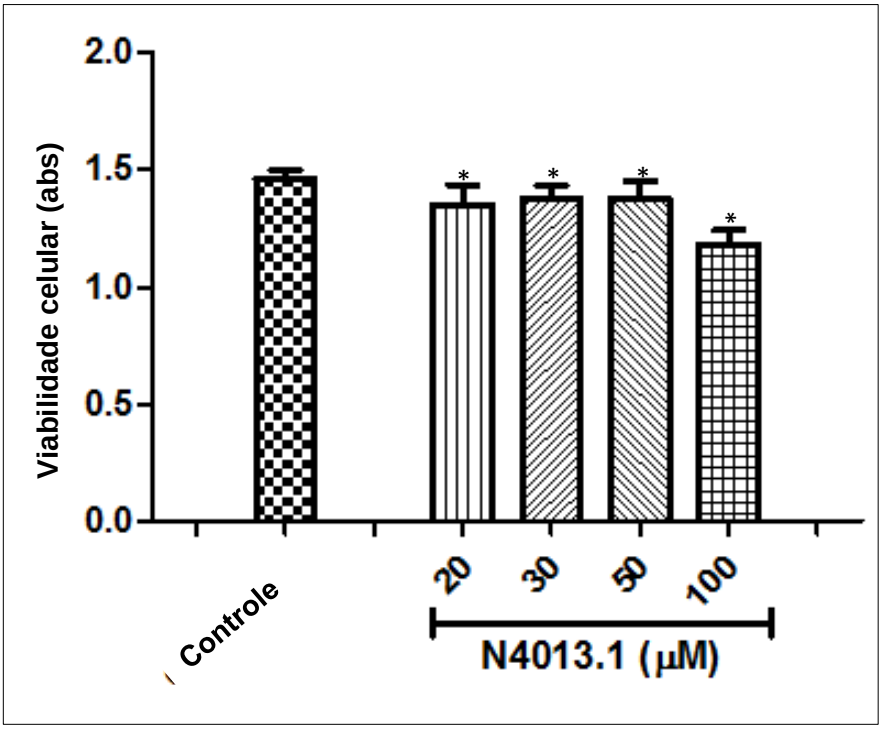


Fig. 9 - Viabilidade das células hospedeiras LLC-MK2 após o tratamento com o composto N4013.1. As células hospedeiras foram tratadas com concentrações crescentes do composto até 100 µM durante 48h. A toxicidade do complexo para as células hospedeiras foi avaliada pelo ensaio MTS.

5.5 Análise por microscopia óptica de células LLC-MK2 tratadas ou não com o composto N4013.1 e sulfadiazina após 48 h.

Imagens de microscopia óptica foram feitas para analisar a organização dos parasitos no interior dos vacúolos parasitóforos após 48h de tratamento com o composto N4013.1 e sulfadiazina na concentração de 10 µM. Em células não tratadas (controle), houve maior proliferação do *T. gondii (*Figura 10 A e B). Células tratadas com sulfadiazina e com o composto N4013.1 demonstraram redução no crescimento de *T. gondii. (*Figura 10 C, D, E e F).

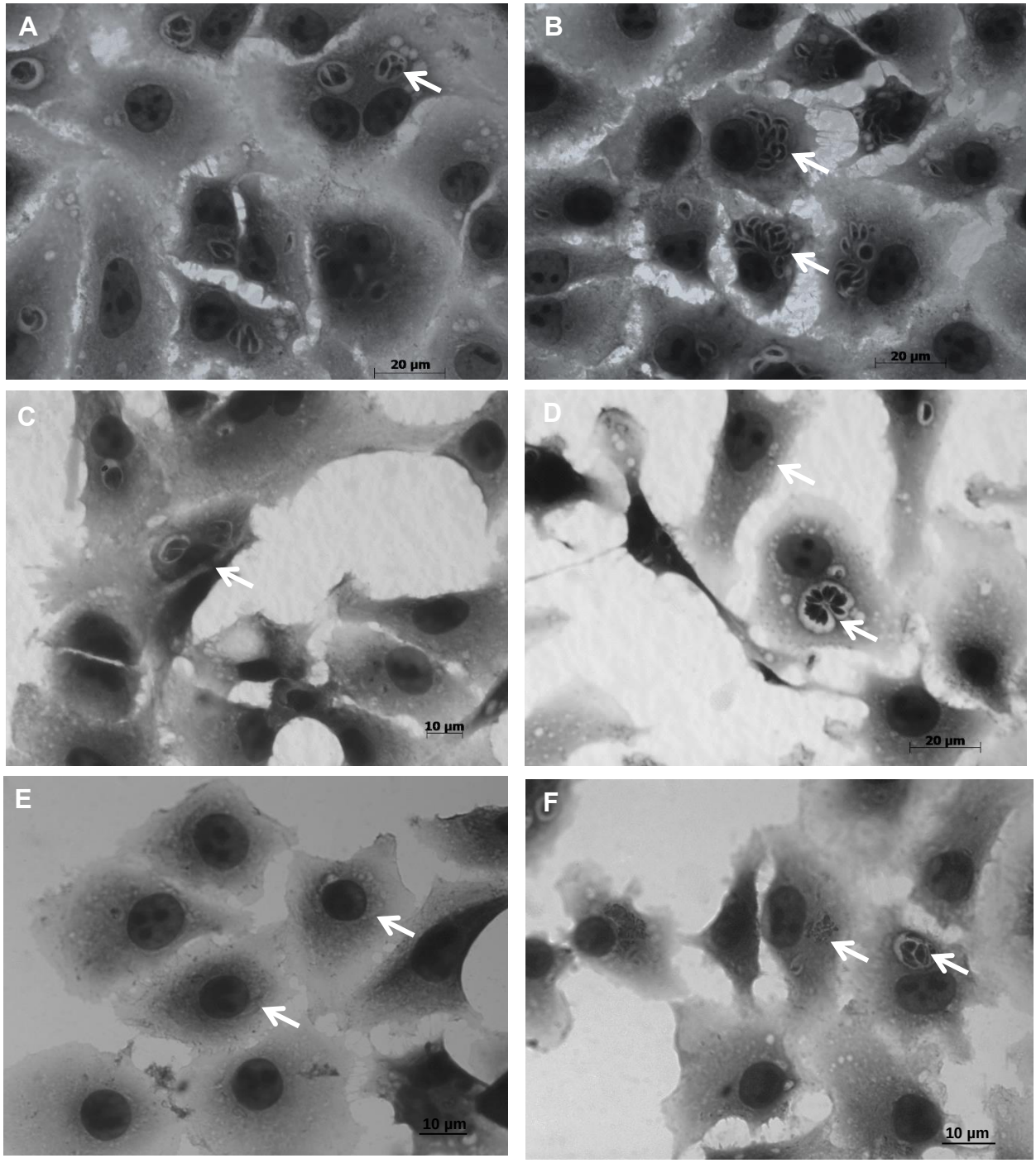
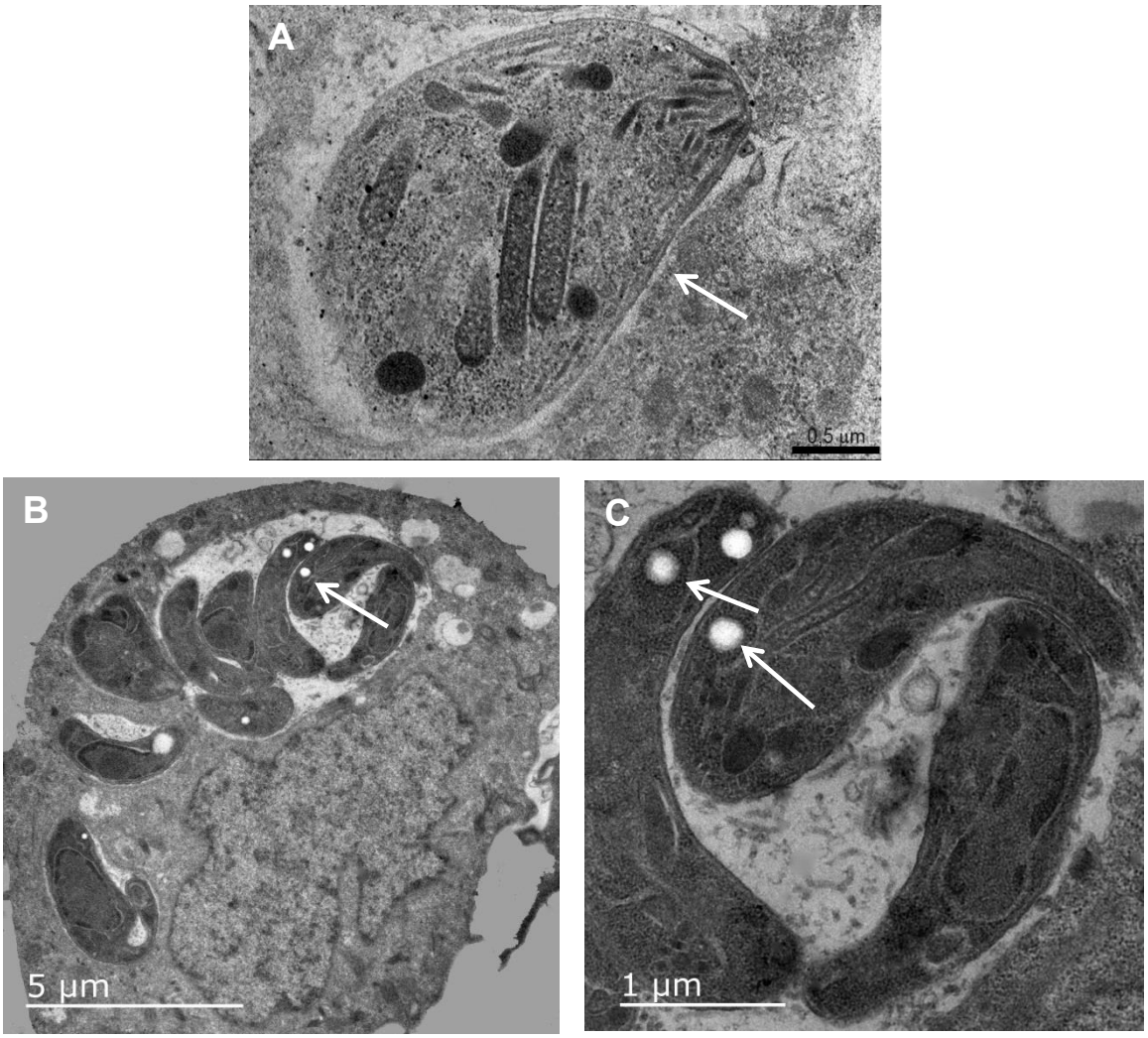


Fig. 10 - Microscopia óptica de células LLC-MK2 infectadas com *Toxoplasma gondii* não tratadas e tratadas com sulfadiazina e o composto n4013.1 na concentração de 10 µM. (A, B) Células infectadas e não tratadas (controle), note a presença de rosáceas e grande quantidade de parasitos no interior das células (setas). (C, D) Células infectadas e tratadas com sulfadiazina na concentração de 10 µM por 48h, note a presença do parasito no interior da célula, porém em menor quantidade (setas). (E, F) Células infectadas e tratadas com 10 µM do composto N4013.1 durante 48h, note que muitas células não possuem parasitos em seu interior e que há presença de vacúolos com parasitos degradados no interior dos vacúolos (setas). Barras = 10 µm e 20 µm.

5.6 Análise por microscopia eletrônica de transmissão de células LLC-MK2 infectadas por *T. gondii*, tratadas ou não com SDZ e o composto N4013.1 após 48 h.

A análise da ultraestrutura das células mostra que os parasitos presentes em células não tratadas após 48h de infecção, apresentam sua ultraestrutura preservada (Figura A seta). Após o tratamento com sulfadiazina é possível observar estruturas semelhantes a grânulos de amilopectina (Figura B e C) (setas brancas). Após o tratamento com o composto N4013.1 nota-se que o parasita parece sofrer com a ação do composto, apresentando degradações no ambiente citoplasmático *(clefts*) e *blebs* de membrana (Figura D) (setas brancas e círculo respectivamente) e além disso, observa-se irregularidades na formação de conóides (Figura 11 E) (setas brancas).



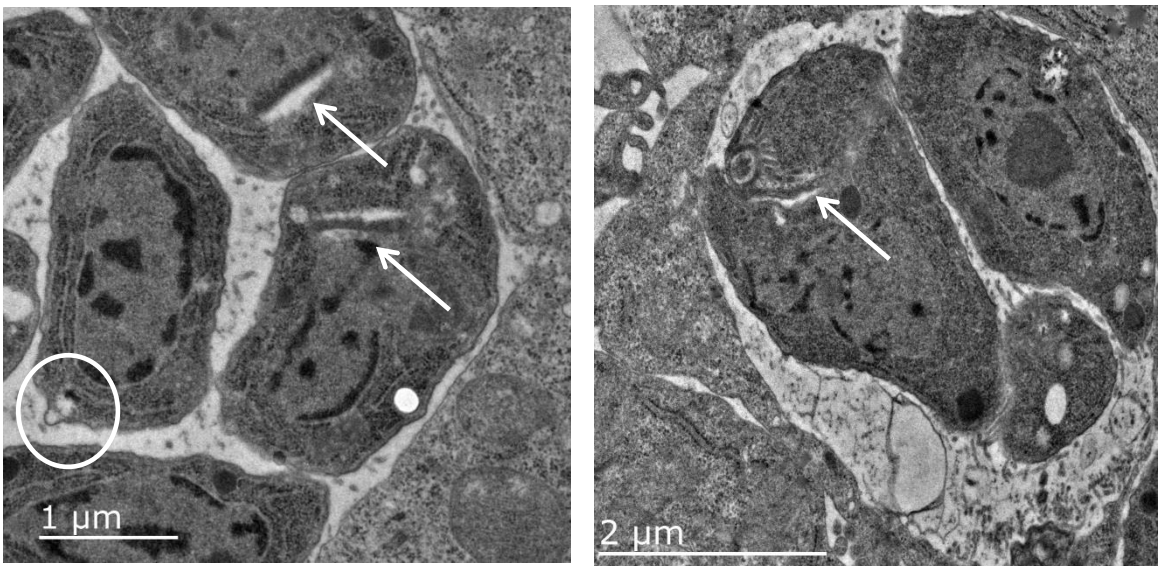


Fig. 11 - Microscopia eletrônica de transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *T. gondii* tratadas ou não com 10 µm de SDZ e 10 µm do composto N4013.1. (A) *T. gondii* dentro de células não tratadas após 48 h de infecção. Observe que a estrutura típica de taquizoíto foi preservada. (B e C) (setas brancas) tratamento com sdz por 48h, nota-se grânulos semelhantes a grânulos de amilopectina. (D e E) tratamento com o composto N4013.1 durante 48 h. (D) (círculo) *blebs* de membrana e *clefts* (setas) e (E) nota-se que o parasita iniciou a formação de conoíde mas com estrutura irregular (seta branca). Barras: A = 0,5 µm, B = 5 µm, C e D = 1 µm e E = 2 µm.

5.7 Parede cística de *T. gondii* por microscopia de fluorescência.

O aparecimento de bradizítos foi confirmado após marcação com lectina DBA, que se liga especificamente a parede dos cistos de bradizoíto. Alguns vacúolos parasitóforos marcados com DBA foram vistos em células incubadas por 48h de tratamento com o composto N4013.1 (Figura 12 C e D), da mesma forma, em células tratadas com sulfadiazina (Figura 12 E e F). Células infectadas e não tratadas (controle) não apresentaram marcação positiva (Figura 12 A e B).

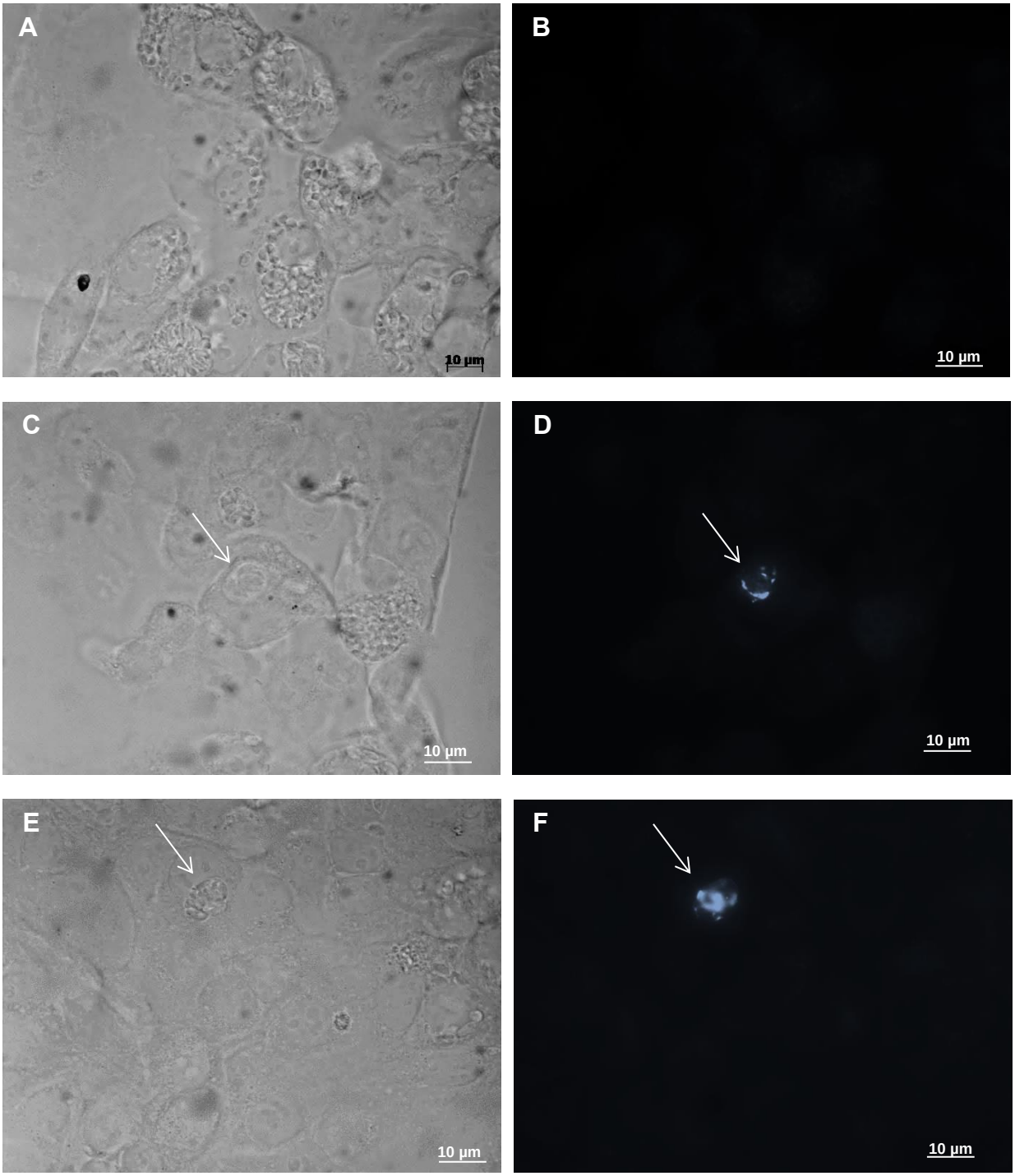


Fig. 12 - Microscopia de fluorescência mostrando que o tratamento com o composto N4013.1 e sulfadiazina na concentração de 10 µM durante 48h induziram o aparecimento de cistos teciduais de *T. gondii*. A, C e E - Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). B, D e F - Marcação para lectina de *Dolichos biflorus* (DBA). (setas:A,B) Células não tratadas e parasitos não marcadas (controle). Parede cística (setas: C, D, E e F). Marcação positiva para DBA em células tratadas com 10 µM do composto N4013.1 por 48h (setas: C, D) e (setas: E, F) células tratadas com sulfadiazina durante 48h na concentração de 10 µM. Barras = 10 µm.

5.8 Avaliação de morte por autofagia de *T. gondii* após o tratamento com o composto N4013.1 e sulfadiazina

Para avaliar os possíveis mecanismos de morte celular sofridos pelo parasito, células LLC-MK2 infectadas por *T. gondii*, tratadas ou não com o composto N4013.1 e sulfadiazina por 48h foram marcadas com LC3B. Células não tratadas e tratadas com sulfadiazina não apresentaram marcação positiva para LC3B (Figura 13 A, B, C e D respectivamente). Células tratadas com 10 µM do composto N4013.1 durante 48h, apresentaram uma baixa quantidade de marcação positiva LC3B. De acordo com a quantificação, apenas 0,01% dos parasitos eram LC3B positivos (Figura 14 A, B, C e D).

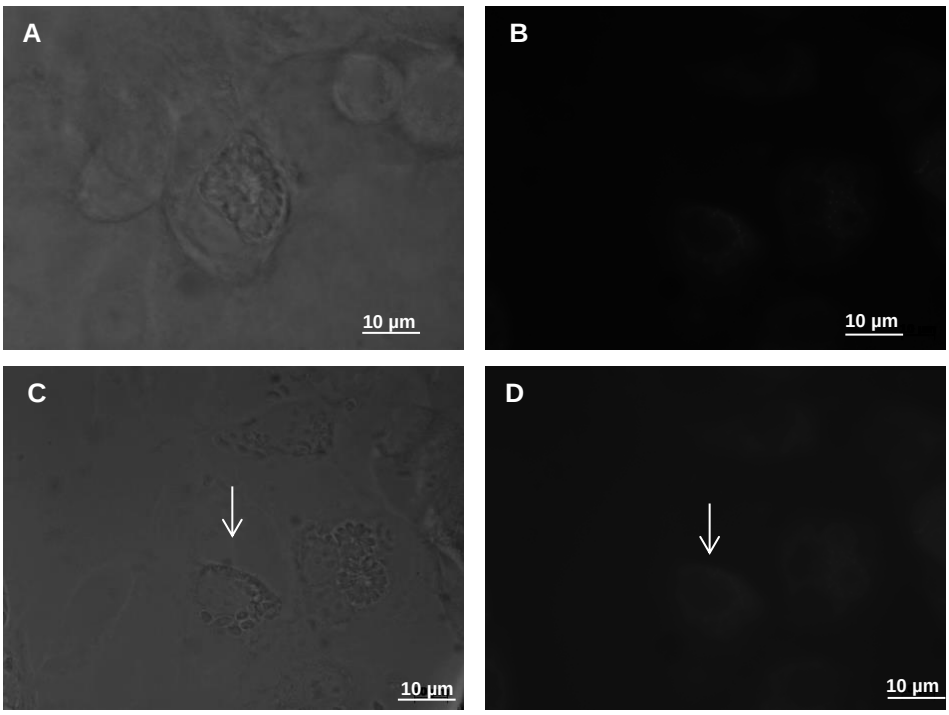


Fig.13 - **Microscopia de fluorescência mostrando marcação negativa para LC3B**. Células não tratadas (A e B) e células tratadas com 10 µM de sulfadiazina por 48h (C e D) não apresentaram marcação positiva para LC3B. (setas). Barras = 10µm.

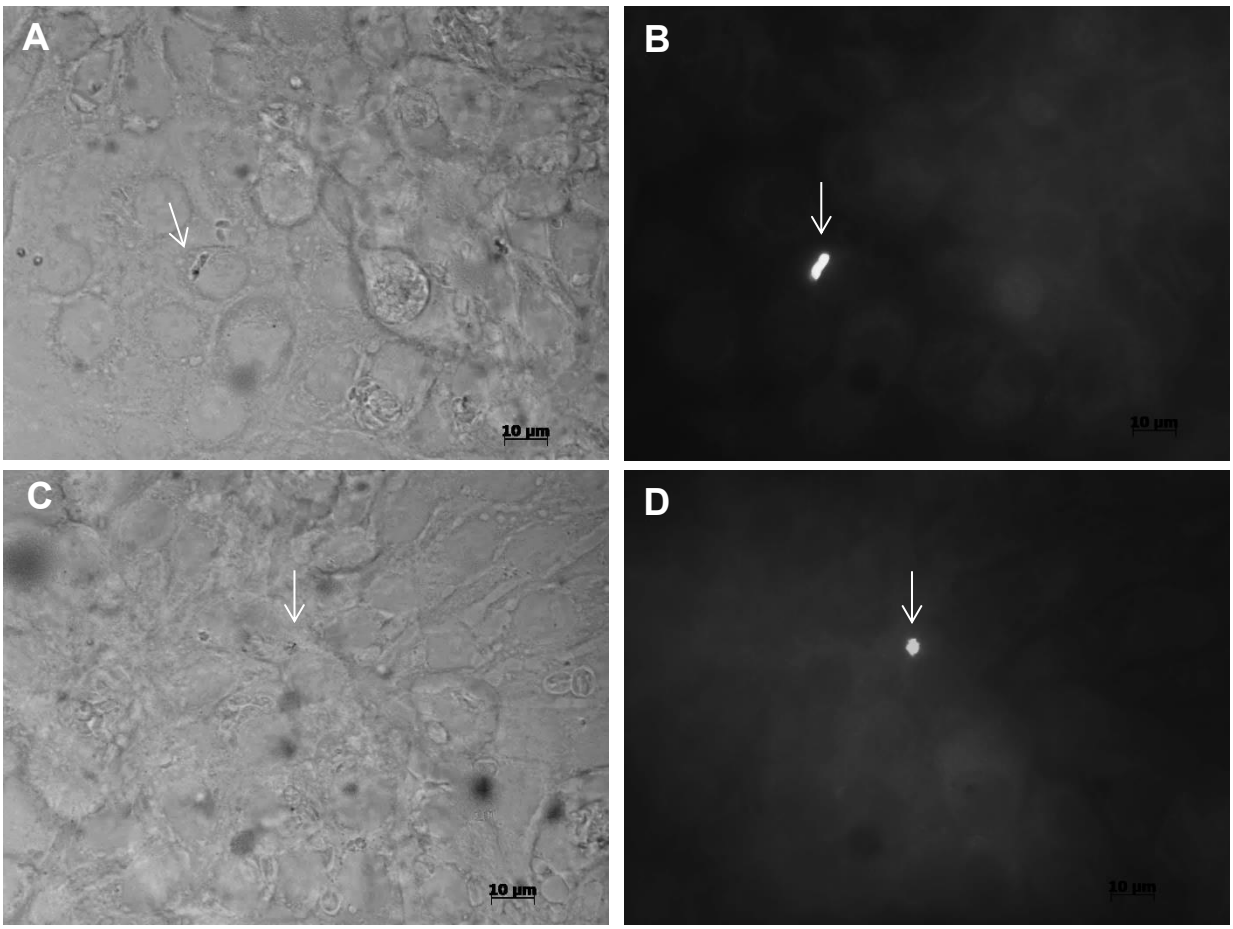


Fig. 14 - Morte Celular por autofagia de *T. gondii* após o tratamento com o composto N4013.1. Imagens de microscopia de fluorescência de células LLC-MK2 infectadas por *T. gondii* mostrando marcação de vesículas autofágicas (LC3B-positivas) após 48h de infecção com 10 µM do composto N4013.1. Parasitos em células tratadas (N4013.1) apresentaram marcação positiva (setas: B e D) e (setas: A e C) marcação para LC3B e imagens de contraste interferencial (DIC). Barras = 10 µm.

6 DISCUSSÃO

A toxoplasmose é infecção causada pelo parasito *T. gondii*, é considerada cosmopolita e aproximadamente um terço da polulação mundial apresenta soro positividade para toxoplasmose. (SILVA *et al*., 2008). O tratamento de pacientes infectados baseia-se na combinação de sulfadiazina à pirimetamina, no entanto, ocorrem severos efeitos colaterais durante o tratamento (Campos *et al*., 2014). O tratamento com graves efeitos colaterais e a inexistência de uma cura definitiva para a doença (LEPORT *et al*., 1988; GEORGIEV, 1994) evidência a importância do desenvolvimento de novas terapias com maior eficiência contra o *T. gondii***.**

No presente trabalho, investigou-se o efeito do composto metalocomplexo coordenado à sulfadiazina (N4013.1) sobre o parasito *T. gondii.*

Estudos descritos na literatura mostraram que a coordenação de compostos pode ser uma alternativa interessante para terapia antiparasitária. Compostos metalocomplexos apresentaram interessantes atividades biológicas como fungicida, bactericida e antiviral (SINGH *et al*., 2000; Nath *et al*., 2001). HORN *et al.* (2005) mostraram que o ligante HPClNOL [1-(bis-piridina-2-ylmetil-amino)-3-cloropropano-2-ol] apresentou interessantes atividades quando associados a complexos de ferro e cobre. O complexo de cobre [Cu(HPClNOL)Cl] apresentou atividade de nuclease, sendo ativo contra células leucêmicas (Fernandes *et al*., 2006). E quando associado ao ferro, observou-se que o composto mononuclear [Fe(HPClNOL)(Cl)2] foi capaz de proteger *Saccharomyces cerevisiae* do estresse oxidativo, mimetizando superóxido dismutase e catalase (Horn Jr *et al*., 2010). As atividades desses compostos contra célula cancerígena foram associadas à baixa toxicidade ás células normais do organismo (Horn Jr. *et al*., 2013). Tais fatos impulsionaram a realização dos testes com o composto metalocomplexo N4013.1 em células fibroblásticas LLCMK2 infectadas com o *T. gondii* uma vez, que a principal desvantagem da terapia antiparasitária atual é não preservar a viabilidade da célula hospedeira.

Verificou-se, que a toxicidade do composto N4013.1 contra o parasita intracelular *T. gondii* em interação com células LLCMK2 ocorre, sugerindo efeito

antiproliferativo do fármaco; sendo também observadas através de microscopia eletrônica de transmissão, degradações no citoplasma como, *clefts e* também *blebs* de membrana, além disso, irregularidades na formação do conóide do parasita e também observações de grânulos de amilopectina indicando a diferenciação de taquizoítos para bradizoítos. O composto foi ainda capaz de reduzir o índice de infecção destas células após 48h de tratamento e apresentou IC50 igual a 3.3 µM, este resultado foi positivo, pois a sulfadiazina que é um fármaco de referência para o tratamento de infecção causada pelo *T. gondii,* tem IC50 variável dependendo da célula hospedeira utilizada. No presente trabalho com células LLCMK2, sulfadiazina apresentou IC50 igual a 4.6 µM, enquanto o composto N4013.1 apresentou IC50 igual a 3.3 µM. Fármacos para o tratamento da Toxoplasmose são eficazes, mas carregam muitos efeitos colaterais, incluindo a supressão da imunidade, e outros sintomas que levam a resistência dos pacientes ao tratamento, como: vômitos, tremores, convulsões e depressão da medula óssea (REMINGTON et al., 2001).

Os resultados desse trabalho mostraram que o composto N4013.1 também apresentou baixa toxicidade para célula hospedeira LLC-MK2, sendo compatível com os resultados obtidos de PORTES *et al*., 20015.

. Dessa forma, sugerem-se futuramente os testes de infecção *in vivo* com o uso do composto N4013.1. Estudos relacionados à quimioterapia antiparasitária se tornam então importantes para o desenvolvimento de novos fármacos potenciais para o tratamento da Toxoplasmose, que ocorrem através da identificação de alvos específicos em vias metabólicas-chaves para os parasitos. Este fato ressalta a importância de estudos como o desenvolvido neste trabalho, que auxiliam na confirmação dos alvos escolhidos para o tratamento quimioterápico. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão mostraram que o controle após 48 horas de interação manteve a sua estrutura e a forma de taquizoítos preservadas, enquanto que após 48 horas de tratamento a 10 µM do composto N4013.1, observou-se a presença de grânulos de amilopectina. É sabido na literatura que a presença desses grânulos é encontrada apenas em bradizoítos, sendo um marcador estrutural de cistogênese. Indicando a diferenciação de taquizoítos para bradizoítos.

A marcação por DBA foi importante na confirmação da diferenciação de taquizítos para bradizoítos. As imagens de microscopia de fluorescência demonstraram essa conversão de taquizoítos em bradizoítos após 48 h de tratamento

a 10 uM do composto N4013.1, confirmada após marcação com lectina específica para parede cística, DBA. Porém, essa marcação quando quantificada demonstrou que a indução de cistogênese foi baixa quando tratada com o composto N4013.1 e sulfadiazina.

Para avaliar o processo de morte celular do parasito as células foram marcadas com marcador específico para autofagia, LC3B. Autofagia foi confirmada em alguns parasitos, aproximadamente 0,01% das células infectadas e tratadas com o composto N4013.1 continham vesículas autofágicas, as células não tratadas e tratadas com sulfadiazina, não apresentaram morte por autofagia.

A baixa quantidade de morte por autofagia em células tratadas com o composto N4013.1, sugere novos experimentos para investigação por outros tipos de morte celular sofrido pelo parasito, como por exemplo, morte por apoptose, detectada através do teste TUNEL.

7 CONCLUSÕES

a) O composto N4013.1 foi ativo contra o *T. gondii in vitro*, sendo capaz de reduzir o índice de infecção das células LLC-MK2, com IC 50 igual a 3.3 µM em 48h de tratamento. O composto coordenado a sulfadiazina apresentou melhor desempenho que a sulfadiazina no modelo de estudo *in vitro*.

b) O composto N4013.1 não apresentou toxicidade às células hospedeiras quando tratadas durante 48h com concentrações até 100 µM.

c) As imagens obtidas por Microscopia eletrônica de transmissão mostraram alterações citoplasmáticas como, *clefts* e alterações na membrana do parasito como o aparecimento de *blebs*, vesículas semelhantes a corpos apoptóticos, porém o teste de TÚNEL que detecta morte por apoptose não foi realizado. Além disso, irregularidade na formação do conóide também foi observada.

d) O composto N4013.1 induziu a baixa quantidade de cistos teciduais de *T. gondii* quando tratados por 48h.

e) O composto apresentou uma baixa indução quantidade de morte por autofagia.

8 REFERÊNCIAS

Ahmad, S., Isab, A.A., Ali, S., Al-Arfaj, A.R. Perspectives in bioinorganic chemistry of some metal based therapeutic agents. Polyhedron, 25, 1633, 2006.

Anderson, S.I., Morse, L.M .The influence of solvent on the teratogenic effect of folic acid antagonist in the rat. Exp. Mol. Pathol., 5, 2134–145, 1966.

BONFIOLI, A. A.; OREFICE, F. Toxoplasmosis. Seminars in Ophthalmology, v. 20, n. 3, p. 129–141, Jan. 2005.

Bonhomme, A.; Pingret, L.; Pinon, J.M. Review: Toxoplasma gondii cellular invasion. Parassitologia (1992), 34: 31-43.

Bruijnincx, P.C.A. Sadler, P.J. New trends for metal complexes with anticancer activity. Curr. Opin. Chem. Biol., 12, 197, 2008.

Campos, F.A.; De Andrade, G.M.Q.; Lanna, A.P.S.; Lage, B.F.; Assumpção, M.V.M.; Pinto, J.A. Incidence of congenital toxoplasmosis among infants born to HIV-coinfected mothers: case series and literature review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** (2014), 8: 609-617.

Coppin, A., Varré, J.S., Lienard, L., Dauvillée, D., Guérardel, Y., Soyer-Gobillard, M.O., Buléon, A., Ball, S., Tomavo, S. Evolution of plant-like crystalline storage polysaccharide in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* argues for a red alga ancestry. J Mol Evol, 60, 257–267, 2005.

Couvreur, J., Desmonts, G., Thulliez, P. Prophylaxis of congenital toxoplasmosis. Effects of spiramycin on placental infection. J Antimicrob Chemother, 22 Suppl B, 193-200, 1988.

Dannemann, B., Mccutchan, J.A., Israelski, D., Antoniskis, D., Leport, C., Luft, B., Nussbaum, J., Clumeck, N., Morlat, P., Chiu, J. Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. A randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. The California Collaborative Treatment Group. Ann Intern Med. v. 116, p. 33-43, 1992.

De Souza, W., Campanati, L., Attias, M. Strategies and results of field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) in the study of parasitic protozoa. Micron, 39, 77–87, 2008.

De Souza, W., Martins-Duarte, E.S., Lemgruber, L., Ayres, L.C., Attias, M., Vommaro, R.C. Considerações atuais sobre a biologia do *Toxoplasma gondii* e sua interação com a célula hospedeira. AANM, 1, 31–50, 2010.

Denkers, E.Y., Gazzinelli, R.T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. Clin Microbiol Rev, 11, 569–588, 1998.

Dubey, J.P. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. Vet Parasitol, 126, 57–72, 2004.

Dubey, J.P., Speer, C.A., Shen, S.K., Kwok, O.C., Blixt, J.A. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. J Parasitol, 46, 11–21, 1997.

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.

Dubey, J.P., Frenkel, J.K. Experimental toxoplasma infection in mice with strains producing oocysts. J Parasitol, 59, 505–512, 1973.

Dubey, J.P., Frenkel, J.K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and development of toxoplasmosis cysts. J Protozool, 23, 537–546, 1976.

Eyles, D.E., Coleman, N. Evaluation of the curative effects of pyrimethamine and sulfadiazine, alone and in combination, on experimental mouse toxoplasmosis. Antibiot Chemother, 5, 529–539, 1955.

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. Synthesis, crystal structure, nuclease and in vitro antitumor activities of a new mononuclear copper(II) complex containing a tripodal N3O ligand. Inorg Chim Acta, 359, 3167-3176, 2006.

Fernandes, C., Horn Jr., A., Vieira-da-Motta, O., De Assis, V.M. Rocha, M.R., Mathias, L.S., Bull, E.S., Bortoluzzi, A.J. Guimarães, E.V. Almeida, J.C.A., Russell, D.H. Synthesis, characterization and antibacterial activity of FeIII, CoII, CuII and ZnII complexes probed by transmission electron microscopy. J Inorg Biochem, 104, 1214–1223, 2010.

Fontes, A.P.S., César, E.T., Beraldo, H. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola: A Química Inorgânica na Terapia do Câncer, 6,13, 2005.

Frenkel, J.K., Hitchings, G.H. Relative revesal by vitamins (p-aminobenzoic, folic and folinic acids) of the effects of sulfadiazine and pyrimethamine on Toxoplasma, mouse and man. Anábiot Chemother, 7, 630–638, 1957.

Frenkel, J.K., Weber, R.I.V., Lunde, K.I.N. Acute toxoplasmosis. Effective treatment with pyrimethamine, sulfadiazine, leucovorin, calcium, and yeast. JAMA, 173, 1471–1476, 1960.

Garin, J.P., Eyles, D.E. Le traitement de la toxoplasmose experimentale de la souris par La spiramycine. **La Presse Médicale.** (1958), 66: 957–958.

Garin, J.P., Pellerat, J., Maillard, Woehrle, R., Hezez. Bases theoriques de la prevention par la spiramycine de la toxoplasmose congenittale chez la femme enceinte. Presse Med, 76, 2266, 1968.

Georgiev, V.S. Management of toxoplasmosis. Drugs, 48, p. 179-188, 1994.

Guerra, W., Azevedo, E.A., Monteiro, A.R.S., Bucciarelli-Rodriguez, M., Chartone-Souza, E., Nascimento, A.M.A., Fontes, A.P.S., Le Moyec, L., Pereira-Maia, E.C.J. Inorg Biochem, 99, 2348, 2005.

Haverkos, H.W. Assessment of therapy for toxoplasma encephalitis. The TE Study Group. Am. J. Med., 82, 907–14, 1987.

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.

H.L. Singh, M. Sharma, A.K. Varshney, Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem. 30 445–456; 2000.

Horn Jr A, Fernandes C, Bortoluzzi AJ, Vugman NV, Herbst MH. Coordination chemistry of the new ligand 1-(bis-pyridin-2-ylmethyl-amino)-3-chloropropan-2-ol (HPClNOL) with copper(II). X-ray crystal structure, spectroscopic and electrochemical properties of the complex [Cu(HPClNOL)(CH3CN)](ClO4)2. J Molec Struct, 749, 96-102, 2005.

Horn Jr A, Fernandes C, Parrilha GL, Kanashiro MM, Borges FV, De Melo EJT, Schenk G, Terenzi H, Pich CT. Highly efficient synthetic iron-dependent nucleases activate both intrinsic and extrinsic apoptotic death pathways in leukemia cancer cells. J Inorg Biochem, 128, 38–47, 2013.

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.

INNES, E. A. A brief history and overview of Toxoplasma gondii. Zoonoses and public health, v. 57, n. 1, p. 1–7, Feb. 2010.

Johnston, S.L. Macrolide antibiotics and asthma treatment. J Allergy Clin Immunol, 117, 1233-6, 2006.

Katlama, C., De Wit, S., O´doherty, 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.

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.

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.

Li X-L, Wei H-X, Zhang H, Peng H-J, Lindsay DS. A Meta Analysis on Risks of Adverse Pregnancy Outcomes in *Toxoplasma gondii* Infection. **PLoS ONE** (2014) 9: e97775. doi:10.1371/journal.pone.0097775.

Liu, Q.; Wang, Z.D.; Huang, S.Y.; Zhu, X.Q. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii.* **Parasites and Vectors** (2015), 8:292.

Lyons, R. E. and Johnson, A. M. Heat shock proteins of Toxoplasma gondii. Parasite Immunology, 17, 353-359, 1995.

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, R. 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.

Milewska-Bobula, B., Lipka, B., Gołąb, E., Dębski, R., Marczyńska, M., Paul, M., Panasiuk, A., Seroczyńska, M., Mazela, J., Dunin-Wąsowicz, D. Recommended management of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women and their children. Przegl Epidemiol, 69, 291-8, 403-10, 2015.

M. Nath, S. Pokharia, R. Yadav, Coord. Chem. Rev. 215, 99–149. 2001.

Montoya J.G., Liesenfeld, O. Toxoplasmosis.The Lancet, 363, 1965–1976, 2004.

Morrissette, N. S., Sibley, L. D. Disruption of microtubules uncouples budding and nuclear division in *Toxoplasma gondii*. J Cell Sci, 115, 1017-1025, 2002.

Nath, A., Sinai, A.P. Cerebral Toxoplasmosis. Curr Treat Options Neurol, 5, 3–12, 2003.

Nath, M., Pokharia, S., Yadav, R. Organotin (IV) complexes of amino acids and Peptides. Coord Chem Rev, 215, 99–149, 2001.

Niel, G.; Videau. D. Activité de la spiramycione in vitro sur *Toxoplasma gondii*. **Reunión Inter Discipl. Chimioth. Antiinfect** (1981), 121: 8.

Orgiv, C., Abrams, M.J. Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. Chem Rev, 99, 2201-2203, 1999.

Parrilha, G.L., Fernandes, C., Bortoluzzi, A.J., Szpoganicz, B., Silva, M.S., Pich, C.T., Terenzi, H., Horn Jr, A. A new µ-oxo di-iron complex with suitable features to mimic metallohydrolase activity: X-ray molecular structure, aqua solution behavior and nuclease activity of the complex [Fe(HPClNOL)(SO4)]2-l-oxo. Inorganic Chemistry Communications, 11, 643–647, 2008.

Paula, F. C., Guerra, W., Silva, I.R., Silveira, J.N., Botelho, F.V., Vieira, L.Q., Pereira-Maia, E.C., Chem. Biodiversity, 5, 2124, 2008.

Peters, P.J., Thigpen, M.C., Parise, M.E., Newman, R.D. Safety and toxicity of sulfadoxine/pyrimethamine: implications for malaria prevention in pregnancy using intermittent preventive treatment. Drug Saf, 30, 481–501, 2007.

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.

Remington, J.S., McLeod, R., Thulliez, P., Desmonts, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J.S. and Klein, J. (eds) Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, 5 ed., Philadelphia, PA: W. B. Saunders, 205–346, 2001.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 2, p. 264‑96, Apr. 2012.

Schwietert, C., Mccue, J., Bortoluzzi, A. Cordination compounds in medicinal chemistry. Coordination Chemistry Reviews, 184, 67-89, 1999.

Sheffield, H.G., Melton, M.L. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol. 54, 209-226, 1968.

Silva, P.P., de Paula, F.C.S., Guerra, W., Silveira, J.N., Botelho, F.V., Vieira, L.Q., Bortolotto, T., Fischer, F.L., Bussid, G., Terenzi, H., Pereira-Maia, E.C. Platinum(II) compounds of tetracyclines as potential anticancer agents: cytotoxicity, uptake and interactions with DNA. J Braz Chem Soc, 21, 1237, 2010.

Singh, H.L., Sharma, M., Varshney, A.K. Studies on coordination compounds of organotin (IV) with Schiff bases of amino acids. Synth React Inorg Met-Org Chem, 30, 445–456, 2000.

Stramba-Badiale, M. *et al*. Interval prolongation and risk of life-threatening arrhythmias during toxoplasmosis prophylaxis with spiramycin m neonates. Am Heart J, 133, 108–111, 1997.

Sullivan, W.J., Jeffers,V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. National Institutes of Health Public Access, 36, 717-733, 2012.

Tan, Y.T., Tillett, D.J., McKay, I.A. Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. Mol. Med. Today, 6, 309, 2000.

Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M. *Toxoplasma gondii*: from an¬imals to humans. Int. J. Parasitol., 30, 1217-1258, 2000.

Van Rijt, S.H. Sadler, P.J. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. Drug Discov Today, 14, 1089, 2009.

Vilela-Ribeiro, E.B., Benite, A.M.C., Soares, M.H.F.B. Uma revisão conceitual de metáis como suporte para seu ensino. Revista Ibero-americana de Educacão, 55, 1-10, 2011.

Weiss, L.M., Kim, L. Bradyzoite Develpment. In: *Toxoplasma gondii* - The model apicomplexan: perspectives and methods. Ed Academic Press, 341–366, 2007.

WHO, Model Prescribing Information: Drugs Used in HIV-Related Infections, 1999.

Wright, G.D., Sutherland, A.D. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. Trends Mol Med, 13, 260, 2007.

ANEXO

- ✓ **ARTIGO CIENTIFICO PUBLICADO NA REVISTA ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**

"Reduction of *Toxoplasma gondii* development due to inhibition of parasite antioxidant enzymes by a dinuclear iron(III) compound" Juliana de Araujo Portes, **Tatiana Guinancio de Souza**, Thiago Alves Teixeira dos Santos, Luciana Lemos Rangel da Silva, Thales de Paula Ribeiro, Marcos Dias Pereira, Adolfo Horn Junior, Christiane Fernandes, Renato Augusto Damatta, Wanderley de Souza, Sergio Henrique Seabra. Antimicrob Agents Chemother, 59, 7374-86, 2015.