

# ANALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-*TOXOPLASMA GONDII* DE COMPOSTOS METALOCOMPLEXOS COORDENADOS OU NÃO A SULFADIAZINA

Data de aceite: 03/07/2023

**Ary Guedes Porto Duarte**

**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, fármacos que utilizam de um núcleo metálico, os 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, 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. Algumas das vantagens desses fármacos é a de apresentarem um aumento da lipofilicidade, facilitando a passagem do composto através das membranas biológicas e assim necessitando de menores concentrações para obtenção da atividade biológica necessária além de reversão de perfis de resistência da célula-alvo. 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 a obligate intracellular protozoan that is able of infecting 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 metallocomplexe compounds, which are inorganic compounds that present promising biological activity as fungicide, bactericide and antiviral. The metallocomplexes, dinuclear ferric compounds N0414 (Fe alfanaftol 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. The compounds will also be used in in vivo tests with mouse models in the acute phase of toxoplasmosis to prove the efficacy of these compounds.

**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 inicia-se 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).

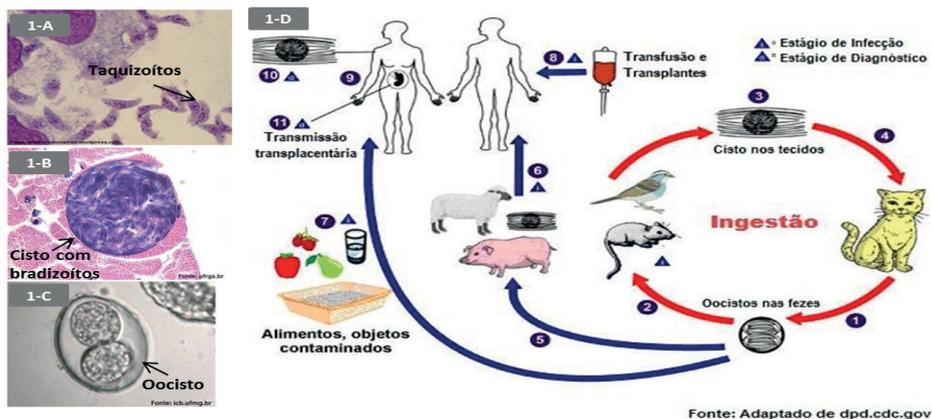


Figura 01: Formas infectantes do *T. gondii* (1A-1C) e ciclo de transmissão do parasito (1D).

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.

### 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, rôptrias, 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 rôptrias 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 sulfas, 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 causada 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)<sub>2</sub>] 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 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 delas.

## 2 | OBJETIVOS:

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-*Toxoplasma* de novos compostos metalocomplexos coordenados *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 interações *in vitro* de células LLCMK2 infectadas com *Toxoplasma gondii* tratadas com metalocomplexos;
- Avaliar a ultraestrutura das células tratadas ou não durante interação com *Toxoplasma gondii* por microscopia eletrônica de transmissão;
- Avaliar um possível efeito citotóxico do composto em relação à célula hospedeira;

## 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 25cm<sup>3</sup>, contendo meio RPMI e 5% de SFB. O pH do meio foi mantido em atmosfera com CO<sub>2</sub> a 5% em estufa de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C. Vinte e quatro horas antes de cada experimento, 2x10<sup>5</sup> 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 ÍNDICE DE SELETIVIDADE.

Para o cálculo do Índice de Seletividade (I.S) dos compostos, as células hospedeiras foram tratadas em concentrações de 20 a 500 µM durante 48h e posteriormente foi determinada a porcentagem de células viáveis após incubação em azul de tripan ou rodamina 123, como descrito no item 3.4. O I.S foi calculado de acordo com a fórmula abaixo, onde o IC50 corresponde à concentração inibitória de 50% do crescimento das células hospedeiras (IC50 células hospedeiras) ou dos parasitas (IC50 parasitas): I.S = IC50 células hospedeiras / IC50 parasitas.

### 3.6 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.

### 3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-PROLIFERATIVA DOS COMPOSTOS.

Após 1h de interação, e 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 lâminulas 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.

### 3.8 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 CaCl<sub>2</sub> 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 3) 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 contra as células hospedeiras.

Figura 3A

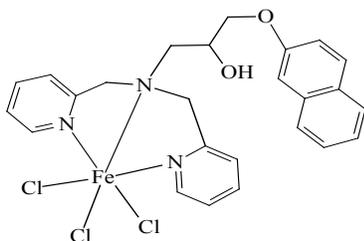
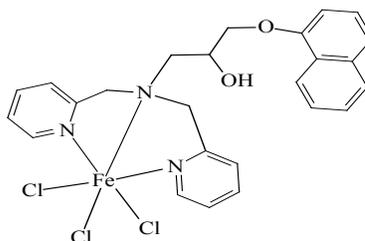


Figura 3B



Legenda: Figura 03A: N5814 (Fe beta-naftol BMPA); Figura 03B: N0414 (Fe alfa-naftol 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  $10\mu\text{M}$  o composto gera perda da viabilidade celular.

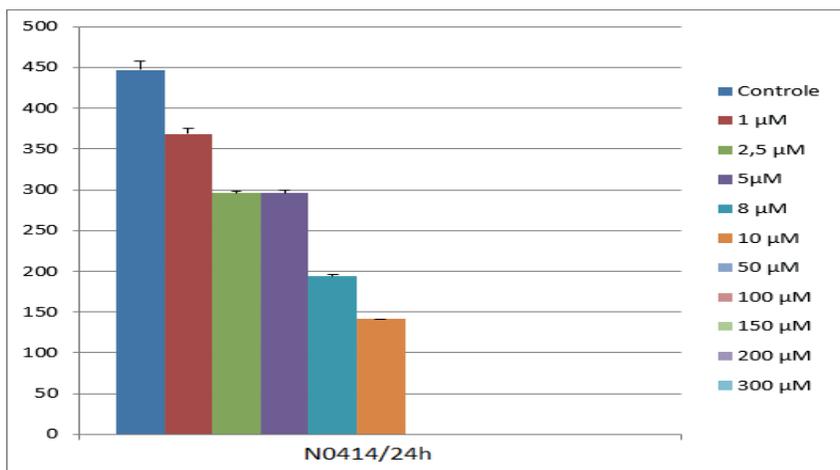


Figura 04: Gráfico representativo de diferentes concentrações do composto N0414 em 24h.

#### 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 $\mu$ M o composto gera perda da viabilidade celular.

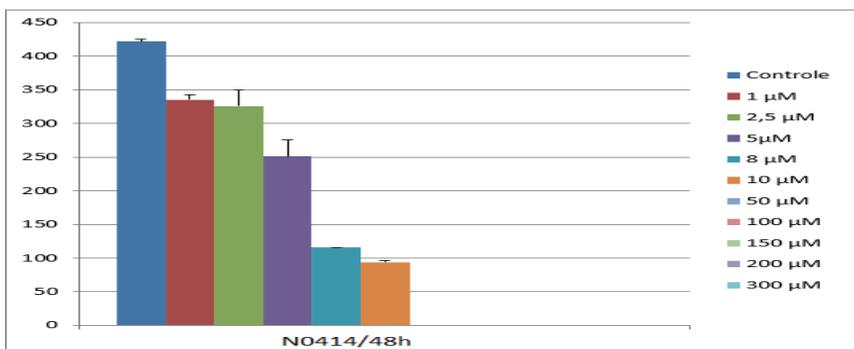


Figura 05: Gráfico representativo de diferentes concentrações do composto N0414 em 48h.

#### 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 $\mu$ M o composto gera perda da mais viabilidade celular.

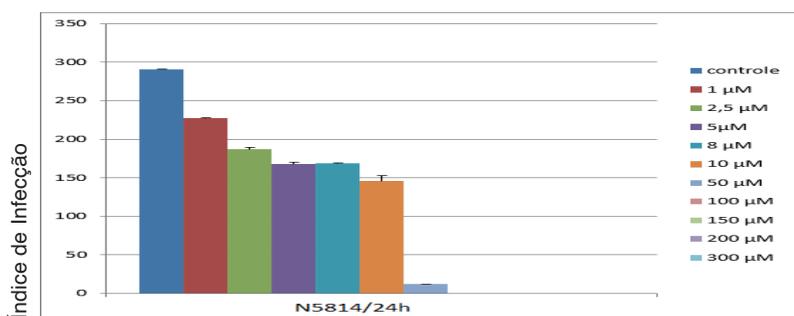


Figura 06: Gráfico representativo de diferentes concentrações do composto N5814 em 24h.

#### 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  $100\mu\text{M}$  o composto gera perda da mais viabilidade celular.

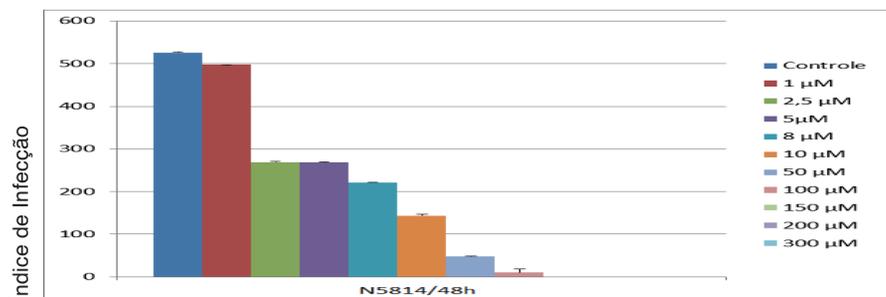


Figura 07: Gráfico representativo de diferentes concentrações do composto N5814 em 48h.

## 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 vis 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 sulfã 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  $10\mu\text{M}$ . 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  $10\mu\text{M}$ . 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  $50\mu\text{M}$ . 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  $100\mu\text{M}$  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 hajam 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.

## 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.

## REFERÊNCIAS:

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.

Dijrkovic-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.

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.

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.

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.

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

Goulart, V., Resende, R. R. Toxoplasmose: A culpa é dos gatos? *Nanocell News*, 14, 2, 2015.

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.

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.

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.

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

Kamalar 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.

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.

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

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

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.

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, S. 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.

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.

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.