

CAPÍTULO 10

AVALIAÇÃO DA EMBRIOTOXICIDADE EM ZEBRAFISH COM O TRATAMENTO DE PIRIMETAMINA E SULFADIAZINA, FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA NEUROTOXOPLASMOSE

Data de submissão: 23/01/2025

Data de aceite: 01/04/2025

Josemar Ferreira Guedes Neto

Curso de Biomedicina, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Jataí, Jataí- Goiás
<http://lattes.cnpq.br/3892335529842447>

Vanessa Bridi

Curso de Biomedicina, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Jataí, Jataí- Goiás
<http://lattes.cnpq.br/2507549337510476>

Débora Pereira Gomes do Prado

Curso de Biomedicina, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Jataí, Jataí- Goiás
<http://lattes.cnpq.br/1564090371585374>

Stéfanne Rodrigues Rezende Ferreira

Curso de Biomedicina, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Jataí, Jataí- Goiás
<http://lattes.cnpq.br/8396448559063761>

Mônica Rodrigues Ferreira Machado

Curso de Medicina Veterinária, Instituto de Biociência animal, Universidade Federal de Jataí, Jataí- Goiás
<http://lattes.cnpq.br/7962178263544668>

Hanstter Hallison Alves Rezende

Curso de Biomedicina, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Jataí, Jataí- Goiás
<http://lattes.cnpq.br/4982752673858886>

RESUMO: A toxoplasmose é causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, sendo uma das infecções cosmopolitas parasitárias mais prevalentes em seres humanos. A toxoplasmose pode ocasionar o comprometimento de vários sistemas, a exemplo do linfático, do cardiorrespiratório e, principalmente, o nervoso, provocando a neurotoxoplasmose. Para o tratamento da neurotoxoplasmose, é utilizado um esquema terapêutico que consiste na associação dos fármacos Sulfadiazina e da Pirimetamina. Esse tratamento geralmente resulta em taxas de sucesso entre 80% a 90% dos casos, no entanto, pode acarretar efeitos adversos. A partir disso, essa pesquisa avaliou a embriotoxicidade de diferentes concentrações da Pirimetamina e Sulfadiazina em embriões de *Danio rerio*. Como resultados, o estudo mostrou que os embriões expostos à combinação de

Pirimetamina e Sulfadiazina obtiveram as menores taxas de sobrevivência, principalmente na concentração de $0,125 \times 10^{-5}$ mg de Pirimetamina associada a concentração de $0,812 \times 10^{-4}$ mg de Sulfadiazina (40% de sobrevivência). Já em relação à exposição dos fármacos de maneira isolada, observou-se uma maior taxa de sobrevivência no grupo exposto a Pirimetamina, chegando a até 90% de sobrevivência. Dessa forma, destaca-se a importância de avaliar a toxicidade de fármacos em vários modelos animais, de modo a identificar possíveis alterações provocadas pelos princípios ativos e diferentes concentrações dos medicamentos.

PALAVRAS-CHAVE: *Danio rerio*, Embriotoxicidade, Neurotoxoplasmosse, Pirimetamina e Sulfadiazina.

EVALUATION OF EMBRYOTOXICITY IN ZEBRAFISH WITH TREATMENT OF PYRIMETHAMINE AND SULFADIAZINE, DRUGS USED IN THE TREATMENT OF NEUROTOXOPLASMOSIS

ABSTRACT: Toxoplasmosis is caused by the obligate intracellular protozoan *Toxoplasma gondii* and is one of the most prevalent cosmopolitan parasitic infections in humans. Toxoplasmosis can affect several systems, such as the lymphatic, cardiorespiratory and, mainly, the nervous system, causing neurotoxoplasmosis. A therapeutic regimen consisting of the combination of the drugs Sulfadiazine and Pyrimethamine is used to treat neurotoxoplasmosis. This treatment generally results in success rates of between 80% and 90% of cases; however, it can cause adverse effects. Based on this, this study evaluated the embryotoxicity of different concentrations of Pyrimethamine and Sulfadiazine in *Danio rerio* embryos. The results of the study showed that embryos exposed to the combination of Pyrimethamine and Sulfadiazine had the lowest survival rates, especially at a concentration of 0.125×10^{-5} mg of Pyrimethamine combined with a concentration of 0.812×10^{-4} mg of Sulfadiazine (40% survival). Regarding the exposure of the drugs in isolation, a higher survival rate was observed in the group exposed to Pyrimethamine, reaching up to 90% survival. Thus, the importance of evaluating the toxicity of drugs in various animal models is highlighted, in order to identify possible changes caused by the active ingredients and different concentrations of the drugs.

KEYWORDS: *Danio rerio*, Embriotoxicity, Neurotoxoplasmosis, Pyrimethamine and Sulfadiazine.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmosse é uma das infecções cosmopolitas parasitárias mais prevalentes em seres humanos, afetando aproximadamente um terço da população mundial (Marzola; Marzola, 2020). Além de representar um risco para os homens, o agente dessa zoonose também pode infectar uma variedade de animais, incluindo os felídeos, que são os hospedeiros definitivos. Essa capacidade de infecção em animais contribui para a disseminação e persistência do parasito no ambiente (Souza *et al.*, 2010).

O agente etiológico da toxoplasmosse é o protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. Esse parasito possui três formas infectantes em seu ciclo de vida, os taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. Cada uma dessas formas pode infectar os seres humanos, podendo ocasionar ao hospedeiro uma ampla forma de parasitismo (Dubey *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2010).

A infecção por *T. gondii* pode ocorrer por meio do consumo de água e/ou alimentos contaminados, através de transfusão sanguínea ou até mesmo via transplacentária (Dubey *et al.*, 2008). Dentre as formas clínicas, a mais comum entre os indivíduos imunocomprometidos é a assintomática/crônica, entretanto, a toxoplasmose pode ocasionar o comprometimento de vários sistemas, a exemplo do linfático, do cardiorrespiratório e, principalmente, do nervoso (Azevedo *et al.*, 2020).

Quando o parasito se associa ao sistema nervoso central, denomina-se de neurotoxoplasmose (NTX). Essa forma clínica pode se apresentar de diversas formas, estando diretamente proporcional a localização do protozoário e a extensão da lesão em que está sendo gerada. Na maioria das vezes, a clínica manifesta-se como encefalite difusa, meningoencefalite ou, ainda, como uma lesão tumoral (Gouvêa-e-Silva *et al.*, 2019).

Para o tratamento da NTX, é utilizado um esquema terapêutico que consiste na utilização dos fármacos Sulfadiazina e Pirimetamina, podendo ser recomendável o uso de corticoides e de ácido fólico (Butler *et al.*, 2013; NIH; CDC; MAIDSAP, 2023). Essas duas drogas principais atuam sinergicamente e como antagonistas do folato, resultando em efeitos nos ácidos nucleicos e, consequentemente, no material genético tanto do parasita quanto do hospedeiro (Nóbrega, 1991; Kadri *et al.*, 2014).

A Sulfadiazina atua na inibição da di-hidropteroato sintetase, resultando na antagonização da formação do ácido di-hidrofólico. Já a Pirimetamina é responsável pela inibição da enzima a di-hidrofolato redutase, resultando na antagonização do ácido tetra-hidrofólico e, de forma concomitante, do ácido folínico (Mendonça, 2014). Uma vez ocorrendo o antagonismo dos ambos ácidos citados anteriormente, o processo de replicação é silenciado, afetando no crescimento parasitário (Kadri *et al.*, 2014).

O esquema terapêutico tradicional, quando administrado corretamente, geralmente resulta em taxas de sucesso entre 80% a 90% dos casos. No entanto, é importante ressaltar que existem efeitos adversos. Entre as consequências do uso dessas drogas, destacam-se as alterações no sistema nervoso, como sequelas neurológicas observadas em aproximadamente 30% a 40% dos casos (Peixoto, 2023).

Sendo assim, pesquisas que avaliem a toxicidade de fármacos, a exemplo da Sulfadiazina e da Pirimetamina, são de extrema importância para a saúde pública. Esses ensaios têm o objetivo de minimizar efeitos colaterais nos seres humanos. Por conseguinte, testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo* visam a determinação do limiar da dose, de modo a preconizar uma concentração mais segura (Camurça-Vasconcelos *et al.*, 2005).

O peixe *Danio rerio*, conhecido popularmente como “zebrafish” ou “Peixe Zebra”, tem-se mostrado como um promissor modelo experimental de estudos de embriotoxicidade. Para tornar a sua utilização eficaz no meio acadêmico, o zebrafish apresenta diversos mecanismos fisiológicos que se assemelham a outros vertebrados, como a estrutura celular, respostas e sinalizações fisiológicas (Truong, 2011). Desse modo, a reproduzibilidade dos seus testes pode ser equiparada às respostas nos seres humanos.

Por conseguinte, o zebrafish vem sendo utilizado em diversas áreas de pesquisas. Dentre as principais vantagens que enfatizam a sua utilização, incluem a semelhança do seu genoma com o genoma humano e possuem características que facilitam o seu manejo, a exemplo do tamanho, ciclo de vida curto, fácil produção e transparências dos embriões e das larvas. Ademais, têm alta sensibilidade a agentes químicos, contribuindo para a avaliação de testes farmacológicos (Nasiadka; Clark, 2012; Vilella *et al.*, 2009).

Diante desse contexto, as pesquisas com embriões emergem como uma das principais áreas de estudo referentes à toxicidade. A viabilidade dessas pesquisas é impulsionada pela notável rapidez da reprodução dos zebrafish. Essa característica oferece uma vantagem significativa, promovendo a rapidez e eficácia nos testes realizados. Além disso, a capacidade de acompanhar todo o ciclo de desenvolvimento dos animais, contribui para uma compreensão mais abrangente dos resultados obtidos (Moussa *et al.*, 2018; Truong, 2011).

O estudo da fase embrionária dos *Danio rerio* é viabilizado pelo conhecimento detalhado dos estágios de desenvolvimento dos embriões. De acordo com Kimmel *et al.*, 1995 apud Siebel; Bonan; Silva (2015, p. 15-16),

“A embriogênese do *zebrafish* já é bem descrita e definida em sete estágios bem claros: a fase de zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação, faríngula (fase filotípica em que o tubo neural já está formado com as vesículas cefálicas e as respectivas estruturas sensoriais, a musculatura segmentar e as extremidades, tais como nadadeiras estão presentes, o coração está na região ventral do corpo, e os arcos branqueais na região bucal) e eclosão da larva, sendo estas fases compreendidas entre as primeiras 72 horas pós-fertilização [...].”

Dessa forma, ao conhecer as características morfofisiológicas de cada fase da embriogênese, como observado na Figura 1, torna-se viável a realização da análise de eventuais alterações embriotóxicas.

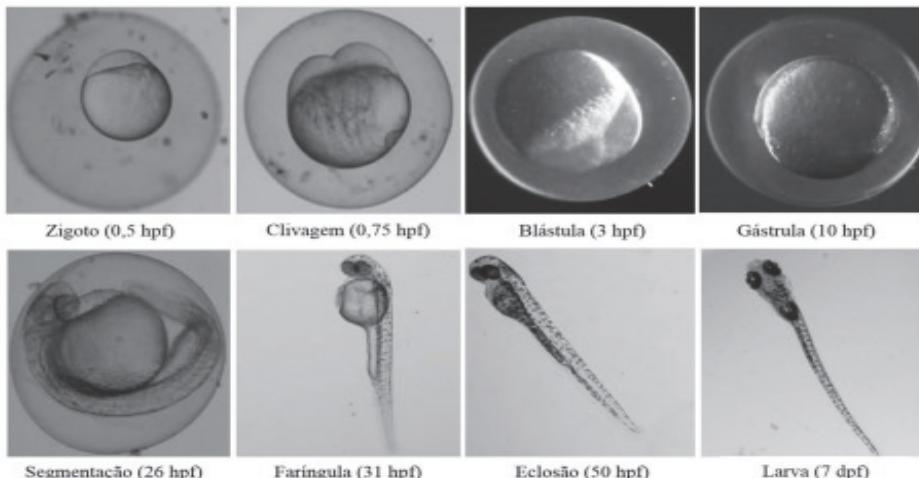


Figura 1: Estágios de desenvolvimento do peixe-zebra.

Fonte: adaptado de Siebel; Bonan; Silva, 2015.

Portanto, esse trabalho tem o objetivo de avaliar a embriotoxicidade de diferentes concentrações da Pirimetamina e Sulfadiazina (de forma isoladas e associadas), drogas utilizadas no tratamento convencional da toxoplasmose.

METODOLOGIA

Comitê de Ética

Para a realização dos testes de embriotoxicidade experimental em zebrafish, o projeto foi submetido à aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA-UFJ), e aprovado sob o protocolo nº 16/2022, o qual seguiu as diretrizes nacionais e internacionais sobre cuidado e manejo de animais empregados em pesquisa.

Embriões

Para a avaliação da embriotoxicidade, foram utilizados embriões da espécie *Danio rerio*, linhagem AB, com idade de 2 células, obtidos do Biotério do Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Peixes (LABFISH), da Universidade Federal de Jataí (UFJ).

Os embriões provenientes da reprodução foram transferidos para placas de petri contendo o meio embrionário E3. Posteriormente, foram classificados em bons, intermediários, ruins e não fecundados através da análise microscópica utilizando como padrão a coloração, disposição e proliferação celular, além da fecundação do ovo e malformação (Kimmel et al., 1995; Lammer et al., 2009; OECD, 1998 e 2013).

Os embriões classificados como bons foram alocados em uma placa de polipropileno, coloração branca e fundo transparente com 24 poços, que contém 4 linhas e 6 colunas. Nas linhas (A/B/C/D) foi adicionado, consecutivamente, pirimetamina, sulfadiazina, pirimetamina+sulfadiazina, e controles negativos. Já nas colunas (1/2/3/4/5/6), diferentes concentrações foram colocadas, a partir de uma diluição seriada.

Durante as 120 horas de análises, as placas foram mantidas em uma estufa a 27,8°C.

Teste Piloto

Foi realizado um piloto do experimento de embriotoxicidade a fim de rastrear as concentrações mais promissoras. Para isso, 6 diferentes concentrações foram utilizadas e colocadas nos poços de 1 a 6, das linhas A, B, C e D (pirimetamina, sulfadiazina, pirimetamina+sulfadiazina, e controles negativos). Em cada poço foram colocados 5 embriões, havendo 120 embriões ao total da placa de polipropileno para o piloto.

As concentrações utilizadas foram baseadas nas doses empregadas no estudo de El-Kowrany et al. (2019), realizado com camundongos da linhagem Swiss. No referido estudo, os pesquisadores administraram 4,4 mg/kg/dia de pirimetamina e 250 mg/kg/dia de sulfadiazina. Assim, neste estudo, estas concentrações foram recalculadas, como pode ser observado no Quadro 1, com o objetivo de que a dosagem fosse a mesma, porém apropriada ao peso do embrião, estabelecida em 1,3mg pelo LABFISH.

PIRIMETAMINA	SULFADIAZINA
Dose: 4,4 mg/Kg/dia	Dose: 250 mg/Kg/dia
4,4 - 1000000 mg	250 - 1000000 mg
x - 1,3 mg	x - 1,3 mg
$x = 5,72 \cdot 10^{-5}$ mg/mg (x2)	$x = 3,25 \cdot 10^{-4}$ mg/mg (x2)
$x = 1,0 \cdot 10^{-5}$ mg/mg	$x = 6,5 \cdot 10^{-4}$ mg/mg

Quadro 1: Conversão das concentrações utilizadas nos camundongos para o zebrafish.

Fonte: Autoria própria.

As concentrações utilizadas foram escolhidas devido aos resultados positivos observados no referido estudo, que incluíram menor mortalidade e uma maior redução no número de cistos cerebrais em camundongos tratados com ambas as drogas em conjunto, em comparação com outros grupos.

Controles

Para realizar os controles dos testes, empregamos o meio de cultivo embrionário E3, enriquecido com íons essenciais para a maturação embrionária, e o solvente DMSO a 1%, usado para dissolver o fármaco. Ambos foram empregados como controles negativos, permitindo avaliar a viabilidade da reprodução dos peixes e do meio embrionário.

Teste de embriotoxicidade

Com base nas concentrações dos fármacos testadas previamente no piloto, foram realizados ensaios de embriotoxicidade. As concentrações escolhidas para avaliação no teste foram as seis primeiras diluições seriadas estabelecidas durante o piloto (Quadro 2), devido à baixa concentração e à dificuldade de pipetagem.

FÁRMACO	CONCENTRAÇÕES (mg/mg)
Pirimetamina	$1,0 \times 10^{-5}$, $0,5 \times 10^{-5}$, $0,25 \times 10^{-5}$, $0,125 \times 10^{-5}$, $0,062 \times 10^{-5}$ e $0,031 \times 10^{-5}$
Sulfadiazina	$6,5 \times 10^{-4}$, $3,25 \times 10^{-4}$, $1,625 \times 10^{-4}$, $0,812 \times 10^{-4}$, $0,406 \times 10^{-4}$ e $0,203 \times 10^{-5}$

Quadro 2: Concentrações dos fármacos empregados na avaliação de embriotoxicidade.

Fonte: Autoria própria.

Os testes foram realizados em duplicata, utilizando duas placas de polipropileno com 24 poços cada placa, sendo colocados 5 embriões por poço. No total, o estudo analisou 240 embriões.

Dos 240 embriões, cada grupo era composto por: 60 embriões para as concentrações de pirimetamina, 60 embriões para as concentrações de sulfadiazina, 60 embriões para os fármacos associados, 30 embriões para o controle E3 e 30 embriões para o controle DMSO (1%).

Para avaliar a embriotoxicidade, foram observados vários aspectos dos embriões ao longo de um período de 5 dias. No quadro abaixo (Quadro 3), estão listadas as análises realizadas a cada 24 horas.

PERÍODO	ANÁLISES
24 horas	Movimentos involuntários / embrião + vivos e mortos
48 horas	Batimentos cardíacos / embrião + vivos e mortos
72 horas	Alterações teratogênicas + vivos e mortos
96 horas	Alterações teratogênicas + Vivos e mortos
120 horas	Alterações teratogênicas + Vivos e mortos

Quadro 3: Análises realizadas a cada 24 horas.

Fonte: Autoria própria.

Eutanásia do zebrafish

Para a eutanásia dos embriões de zebrafish que sobreviveram, as larvas foram mergulhadas em solução benzocaína 3% até o cessamento do batimento opercular via imersão direta.

Análises estatísticas

Os resultados foram organizados em tabelas de frequência e por meio de gráficos de linhas através da plataforma *online* Google Planilhas. Para isso, os resultados foram organizados e analisados a partir da frequência de positividade e das taxas de sobrevivência e de mortalidade.

RESULTADOS

Análises com a Pirimetamina

Na exposição dos embriões à Pirimetamina, dentre os 60 embriões em todas as concentrações testadas, a taxa de sobrevivência ao final das 120 horas de análise foi de 80%, com 48 embriões sobreviventes e 12 mortos.

Dentre as seis concentrações observadas, as que apresentaram as maiores taxas de sobrevivência foram as $1,0 \times 10^{-5}$ mg, $0,5 \times 10^{-5}$ mg e $0,031 \times 10^{-5}$ mg, todas contendo 90% de sobrevivência. Em contraste, as concentrações $0,125 \times 10^{-5}$ mg e $0,062 \times 10^{-5}$ mg apresentaram menores taxas de embriões vivos, ambas com 70%.

Em comparação com os controles negativos, a taxa geral de sobrevivência foi inferior à sobrevivência dos embriões em meio E3, que foi de 93,33%, enquanto para o DMSO a 1% (73,33%), mostrou-se superior. Além disso, as concentrações que apresentaram as maiores quantidades de embriões vivos estiveram dentro do intervalo de sobrevivência dos controles, enquanto as concentrações com menores taxas de sobrevivência ficaram próximas aos valores do DMSO (1%) e inferiores aos do meio E3 (Figura 2).

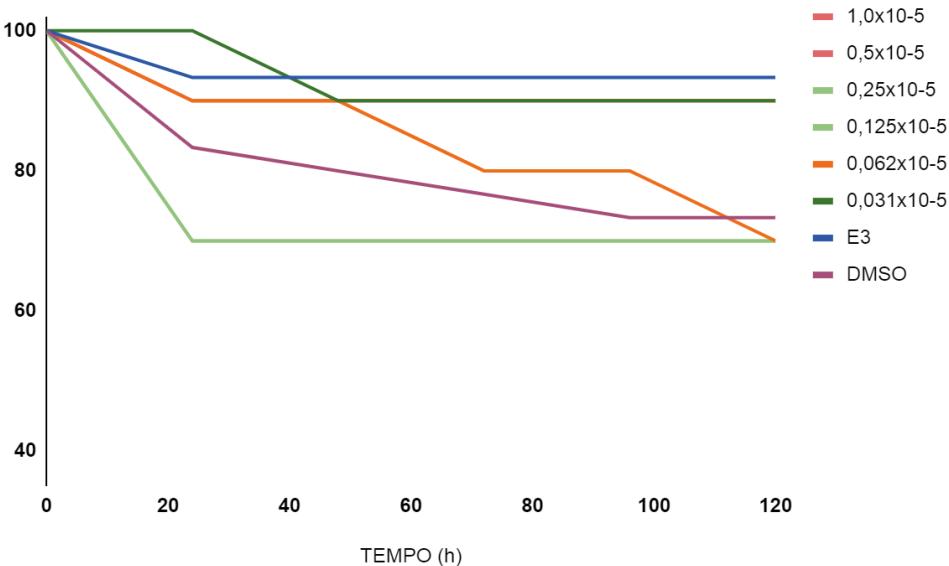


Figura 2: Sobrevida (%) de embriões tratados com Pirimetamina.

Fonte: Autoria própria.

Na análise dos efeitos teratogênicos, as principais interferências foram observadas no período de 72 a 96 horas, sendo elas: embriões (3) com alterações na coluna vertebral e (1) com ausência de cabeça. Em relação aos batimentos cardíacos, estes não mostraram alterações significativas, bem como as contagens dos movimentos involuntários. No período esperado para haver a completa eclosão das larvas (96 horas), o único grupo que não havia sido completamente ecloido foi o exposto à concentração de $0,125 \times 10^{-5}$ mg, onde, dos sete sobreviventes, apenas dois embriões tinham ecloido.

Análises com a Sulfadiazina

Já em contato com a Sulfadiazina de forma isolada, dos 60 embriões presentes em todas as diluições, a taxa de sobrevida ao final das 120 horas de análise foi de 63,3%, com 38 embriões sobreviventes e 22 mortos. Observou-se que o número de embriões vivos foi inferior na exposição à Sulfadiazina em comparação com a Pirimetamina.

Entre as seis diluições observadas, a que apresentou a maior taxa de sobrevida foi a $1,625 \times 10^{-4}$ mg, havendo 90% de embriões vivos. Por outro lado, a concentração de $0,406 \times 10^{-4}$ mg obteve a menor taxa de sobrevida, com apenas 40% de embriões vivos.

Em comparação com os controles negativos, a taxa geral de sobrevida foi inferior à sobrevida dos embriões dos controles, tanto para o E3 (93,33%) quanto para o DMSO a 1% (73,33%). Além disso, a concentração que apresentou a maior quantidade de embriões vivos mostrou-se dentro do intervalo de sobrevida dos controles, enquanto a concentração com a menor taxa de sobrevida esteve inferior aos dois controles (Figura 3).

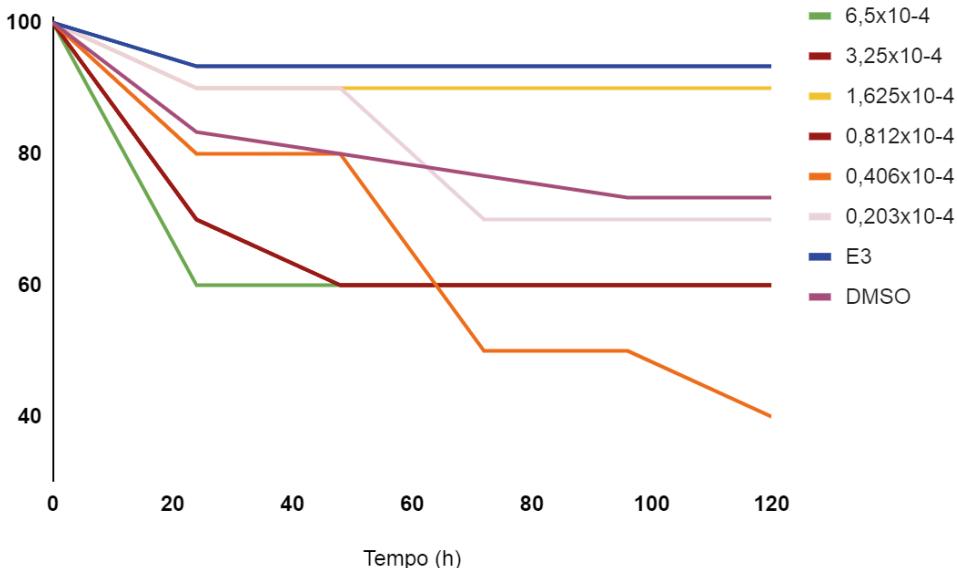


Figura 3: Sobrevida (%) de embriões tratados com Sulfadiazina.

Fonte: Autoria própria.

Na avaliação de teratogenias, as alterações mostraram-se quantitativamente menores do que na exposição isolada da Pirimetamina, havendo um embrião despigmentado e um com alterações na coluna vertebral, ambas no intervalo de 72 a 96 horas. Já os batimentos cardíacos e os movimentos involuntários contados foram abaixo do que o descrito pelos manuais. Ademais, no período de 96 horas, todos os embriões já haviam eclodidos, assim como o esperado.

Análises com a Pirimetamina associada à Sulfadiazina

Por último, em relação aos 60 embriões expostos a combinação da Pirimetamina e da Sulfadiazina, a taxa de sobrevida ao final das 120 horas de análise foi de 58,33%, com 35 embriões sobreviventes e 25 mortos. Percebe-se que o número de embriões vivos resultantes do tratamento convencional da NTX foi inferior tanto em comparação com a Sulfadiazina quanto com a Pirimetamina administradas de forma isolada.

Dentre as combinações avaliadas, as doses que apresentaram as maiores taxas de sobrevida foram as de $0,062 \times 10^{-5}$ mg + $0,406 \times 10^{-4}$ mg e $0,031 \times 10^{-5}$ mg + $0,203 \times 10^{-5}$ mg, havendo 80% de embriões vivos em ambas conjugações. Por outro lado, a exposição com a junção de $0,125 \times 10^{-5}$ mg de Piri mais $0,812 \times 10^{-4}$ mg de Sulfa obteve a menor taxa de sobrevida, com apenas 40% de embriões vivos.

Da mesma forma que ocorreu com a exposição à Sulfadiazina isolada, a taxa geral de sobrevivência foi inferior à sobrevivência dos embriões nos controles, tanto para o E3 (93,33%) quanto para o DMSO a 1% (73,33%). Além disso, as concentrações que resultaram nas maiores quantidades de embriões vivos estiveram dentro do intervalo de sobrevivência dos controles, enquanto as concentrações com menores taxas de sobrevivência foram inferiores a ambos controles (Figura 4).

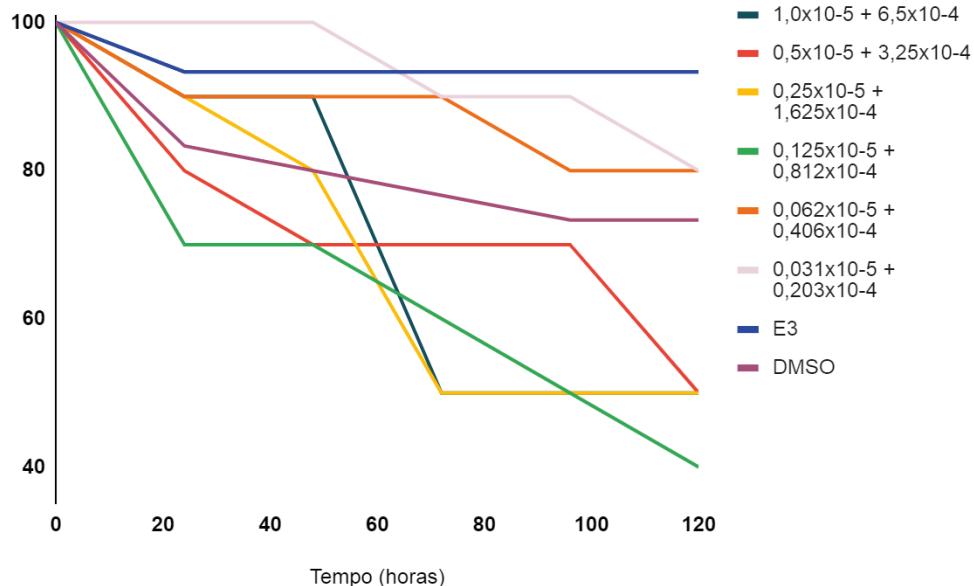


Figura 4: Sobrevivência (%) de embriões tratados com Pirimetamina associada à Sulfadiazina.

Fonte: Autoria própria.

Por fim, os efeitos teratogênicos encontrados na combinação dos dois fármacos foram intensificados do que na exposição isolada de cada um. No intervalo de 72 horas a 96 horas, foram identificados dois embriões com alterações na coluna vertebral (ambos nas concentrações de $0,125 \times 10^{-5}$ mg mais $0,812 \times 10^{-4}$ mg), um embrião com despigmentação ($0,5 \times 10^{-5}$ mg + $3,25 \times 10^{-4}$ mg) e um sem cauda ($0,031 \times 10^{-5}$ mg + $0,203 \times 10^{-4}$ mg). Além disso, tanto os batimentos cardíacos, como os movimentos involuntários mostraram-se, em média, diminuídos. Outra teratogenia observada foi a demora da eclosão, onde todos os grupos apresentaram atrasos.

DISCUSSÕES

Pela ausência de trabalhos realizados com o zebrafish, os efeitos encontrados nessa pesquisa podem ser comparados a outros trabalhos, a exemplo dos realizados com camundongos e até mesmo em efeitos ocasionados nos seres humanos.

Uma análise inicial revela que os embriões expostos à combinação de Pirimetamina e Sulfadiazina mostraram as menores taxas de sobrevivência. Este resultado é divergente aos achados de El-Kowrany *et al.* (2019), que conduziram um estudo com camundongos da linhagem Swiss, registrando resultados positivos no tratamento, inclusive na redução da taxa de mortalidade.

O emprego da terapia Pirimetamina associada à Sulfadiazina consiste em um mecanismo farmacológico classificado como “sinergismo”. Entende-se por sinergismo como fenômeno biológico no qual a ação de fármacos co-administrados é potencializada (Geary, 2012). Todavia, essa intensificação nem sempre se mostra totalmente eficaz, podendo resultar no aumento de efeitos colaterais.

Diante disso, assim como observado uma redução na taxa de sobrevivência dos embriões durante os testes com os fármacos associados, em humanos também podem ocorrer efeitos tóxicos. Dentre essas alterações, pode ressaltar a mielossupressão da medula óssea, resultando em trombocitopenia, neutropenia e leucopenia (Bollani *et al.*, 2022).

Por outro lado, os resultados desta pesquisa estão de acordo com o estudo conduzido por Ribeiro *et al.* (2013), onde, através do cultivo de células BeWo, foi constatado citotoxicidade na associação da Pirimetamina e da Sulfadiazina. Esse paralelo ressalta a relevância de avaliar os potenciais efeitos desses compostos em nível celular ao investigar sua toxicidade.

Da mesma forma que foram observadas diversas respostas aos fármacos, inclusive dentro dos mesmos grupos de exposição, o tratamento da NTX pode apresentar respostas variáveis com diferentes dosagens da associação da Pirimetamina e da Sulfadiazina. Essa variabilidade foi também documentada por Fernandes (2014) em seu estudo com camundongos Swiss fêmeas, evidenciando a complexidade na determinação dos efeitos desses medicamentos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ausência de estudos com a NTX e zebrafish pode limitar a comparação direta dos efeitos observados nesta pesquisa com trabalhos anteriores. No entanto, a comparação com estudos realizados em camundongos e até mesmo em seres humanos, pode oferecer relações valiosas.

Um aspecto que pode ser destacado é a menor taxa de sobrevivência observada nos embriões expostos à combinação de Pirimetamina e Sulfadiazina. Além disso, observou-se uma variabilidade nas respostas aos fármacos e às suas dosagens, inclusive dentro dos mesmos grupos de exposição, indicando que o tratamento com a combinação de Pirimetamina e Sulfadiazina pode resultar em efeitos distintos.

Portanto, em suma, os resultados desta pesquisa destacam a importância de considerar não apenas os efeitos dos fármacos em diferentes modelos animais, mas também a possibilidade de interações complexas entre esses compostos e suas dosagens.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, P. C. G. F. *et al.* **Serological survey and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in cattle from Amazonas, Brazil.** Preventive veterinary medicine, v. 176, p. 104885, 2020.
- BOLLANI, L. *et al.* **Congenital Toxoplasmosis: The State of the Art.** Frontiers in Pediatrics, v. 10, 6 jul. 2022.
- BUTLER, N. J. *et al.* **Ocular toxoplasmosis II: clinical features, pathology and management.** Clinical & experimental ophthalmology, v. 41, n. 1, p. 95-108, 2013.
- CALERO-BERNAL, R.; GENNARI, S. M. **Clinical toxoplasmosis in dogs and cats: an update.** Frontiers in veterinary science, v. 6, p. 54, 2019.
- DUBEY, J. P. *et al.* **Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in Zoo Animals in Selected Zoos in the Midwestern United States.** Journal of Parasitology, v. 94, n. 3, p. 648-653, 2008.
- DUBEY, J. P. *et al.* **Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology.** Parasitology, v. 139, n. 11, p. 1375-1424, 2012.
- FERNANDES, M. D. **Efeito da sulfadiazina e da pirimetamina, isoladamente e em associação, sobre isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de humanos com toxoplasmose congênita em Minas Gerais.** 2014. Dissertação (mestrado em Parasitologia) - Universidade de Minas Gerais, 2014.
- GEARY, N. **Understanding Synergy.** American Journal of Physiological Endocrinology and Metabolism, v. 304, p. E237-E253, 2012.
- GOUVÉA-E-SILVA, L. F. *et al.* **Quality of life and handgrip strength of HIV patients diagnosed with neurotoxoplasmosis.** Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano, v. 21, p. e59185, 2019.
- KADRI, D. *et al.* **The potential of quinoline derivatives for the treatment of *Toxoplasma gondii* infection.** Experimental parasitology, v. 145, p. 135-144, 2014.
- MARZOLA, P. E. R.; MARZOLA, R. V. **Tratamentos alternativos para toxoplasmose ocular: uma revisão integrativa.** Arquivos Catarinenses de Medicina, v. 49, n. 4, p. 98-106, 2020.
- MENDONÇA, J. S. **Princípios gerais de terapêutica de Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii*.** Fiocruz, p. 209-14, 2014.

MOUSSA, E. A. *et al.* Use of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos as a Model to Assess Effects of Mercury on Developing Skeletal Muscle: A Morphometric and Immunohistochemical Study. International Journal of Morphology, v. 36, n. 3, p. 901-908, 2018.

NASIADKA, A.; CLARK, M. D. Zebrafish breeding in the laboratory environment. ILAR Journal 53, 161-168, 2012

NIH; CDC; MAIDSAP. Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in Adults and Adolescents with HIV. [S. l.: s. n.], 2023. Disponível em: <<https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/hiv-clinical-guidelines-adult-and-adolescent-opportunistic-infections/whats-new>>, acesso em 9 mar. 2024.

NÓBREGA, J. P. S. Tratamento da neurotoxoplasmose com a associação sulfametoxazoil-trimetoprim relato de 10 casos. Arquivos de Neuro-Psiquiatria, v. 49, p. 279-284, 1991.

PEIXOTO, R. A. B. *et al.* Neurotoxoplasmose em pacientes portadores de imunodeficiência humana: revisão bibliográfica. Research, Society and Development, v. 12, n. 6, p. e1812641853-e1812641853, 2023.

RIBEIRO, M. *et al.* Ação de azitromicina, espiramicina e da associação de sulfadiazina e pirimetamina na infecção por cepas atípicas (Udi1-CH05 e Udi2-CH05) de *Toxoplasma gondii* em células trofoblásticas humanas (linhagem BeWo). 2013. Dissertação (mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, 2013.

SIEBEL, A. M.; BONAN, C. D.; SILVA, R. S. Zebrafish como modelo para estudos comportamentais. Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações. Blucher, p. 15-56, 2015.

SOUZA, W. *et al.* Organização estrutural do taquizoito de *Toxoplasma gondii*. Scientia Medica, v. 20, n. 1, p. 22, 2010.

TRUONG L.; HARPER S. L.; TANGUAY R. L. Evaluation of embryotoxicity using Zebrafish model. Methods in molecular biology, v. 691, p. 271-279, 2011.

VILELLA, A. J. *et al.* EnsembleCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates. Genome research, 19: 327-335, 2009.