



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RAQUEL ARRUDA DA SILVA SANFELICE

**EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE PRAVASTATINA E  
SINVASTATINA SOBRE AS FORMAS TAQUIZOÍTAS DE  
*TOXOPLASMA GONDII* (CEPA RH) EM CÉLULAS HELA**

RAQUEL ARRUDA DA SILVA SANFELICE

**EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE PRAVASTATINA E  
SINVASTATINA SOBRE AS FORMAS TAQUIZOÍTAS DE  
*TOXOPLASMA GONDII* (CEPA RH) EM CÉLULAS HELA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Idessania Nazareth  
Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo S. Almeida

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Sanfelice , Raquel Arruda da Silva .

Efeito antiproliferativo de Pravastatina e Sinvastatina sobre as Formas Taquizoítas de *Toxoplasma gondii* (cepa RH) em Células HeLa / Raquel Arruda da Silva Sanfelice . - Londrina, 2016.

75 f. : il.

Orientador: Idessania Nazareth Costa.

Coorientador: Ricardo Sérgio Couto Almeida.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Células HeLa infectadas com *Toxoplasma gondii* e tratada com composto alternativo - Tese. 2. Estatinas como tratamento alternativo na toxoplasmose - Tese. I. Costa, Idessania Nazareth . II. Almeida, Ricardo Sérgio Couto. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

RAQUEL ARRUDA DA SILVA SANFELICE

**EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE PRAVASTATINA E  
SINVASTATINA SOBRE AS FORMAS TAQUIZOÍTAS DE  
*TOXOPLASMA GONDII* (CEPA RH) EM CÉLULAS HELA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Idessania Nazareth  
Costa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Ana Lucia Falavigna  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

---

Profa. Dra. Suelen Santos da Silva  
Faculdade de Ensino Superior Dom Bosco –  
FESDB

Londrina, 17 de junho de 2016.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial a minha vida, autor do meu destino e por estar presente a todos os momentos em minha vida, a minha mãe Cleunice Marcondes, meu pai Deson António da Silva, meu querido esposo Luciano Sanfelice, ao meu filho que esta por vir e a Deus que me concedeu forças para continuar meus trabalhos, com muito carinho e apoio não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora professora Dr<sup>a</sup> Idessania Nazareth Costa, que me recebeu de braços abertos e com muita alegria, em seu laboratório, pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade, paciência e incentivo que tornaram possível a conclusão da minha dissertação.

Ao meu Co-orientador professor Dr Ricardo Sergio Almeida, que me ensinou os princípios para o desenvolvimento prático e laboratorial e quanto no aspecto de financiamento da minha pesquisa.

Ao professor Dr Wander Rogério Pavanelli, que concedeu a oportunidade de ingressar no laboratório.

A professora Dr<sup>a</sup> Ivete Conchon-Costa, pelo incentivo, carinho e atenção, durante o curso.

Ao professor Dr Luciano Panagio, por conceder o seu laboratório para a realização dos experimentos.

Ao professor Dr Juliano Bordignon, pelo apoio no desenvolvimento de alguns experimentos e pela oportunidade de poder realizar uma parte do meu trabalho na Fiocruz.

Ao professor Dr Itamar por ter nos cedido as cepas RH de *Toxoplasma gondii*.

Aos professores da pós-graduação pelos ensinamentos, conhecimentos, orientações para o desenvolvimento do meu projeto e a paciência com as minhas dificuldades para a minha formação.

Aos colegas Milena Menegazzo, Suelen Santos da Silva e Larissa Bosqui que, sempre contribuíram para a realização do meu projeto, tanto nos experimentos quanto no auxílio da escrita do projeto.

Aos colegas do laboratório pelo carinho, auxílio, incentivo e colaboração com a minha pesquisa.

Ao técnico Pedro, pelo auxílio técnico durante os experimentos.

Gostaria de agradecer também algumas pessoas que contribuíram para a minha formação durante as disciplinas, como meus amigos Kleber Trugilo, Andreia Carla Pupin, Daniele Sapede Alvarenga.

Agradeço a Deus por todas as dificuldades que encontrei, se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito...

Chico Xavier

SANFELICE, Raquel Arruda da Silva. **Efeito antiproliferativo de Pravastatina e Sinvastatina sobre as Formas Taquizoítas de *Toxoplasma gondii* (cepa RH) em Células HeLa.** 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

Toxoplasmose, infecção causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, assume caráter grave em indivíduos imunocomprometidos e em casos de infecção congênita. Devido à dificuldade no tratamento da toxoplasmose e toxicidade apresentada pelas drogas convencionais, outros compostos vêm sendo pesquisados como tratamento alternativo para esta infecção, destacando-se entre eles as estatinas. As estatinas inibem os processos de síntese do colesterol através da enzima hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase, bloqueando a conversão do substrato HMG-CoA em mevalonato, inibindo os processos iniciais da biossíntese de isoprenóides em humanos e no parasito. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade biológica da pravastatina e sinvastatina isoladamente ou em associação com sulfadiazina e pirimetamina em células HeLa frente à infecção pela cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Células HeLa ( $1 \times 10^5$ ) receberam infecção com taquizoítas de *T. gondii* ( $5 \times 10^5$ ) seguindo dois protocolos diferentes de tratamento. Primeiramente, taquizoítas de *T. gondii* foram pré-tratadas por 30 minutos antes da infecção e no outro protocolo as células foram primeiramente infectadas para posteriormente, serem tratadas por 24 horas. Após os ensaios fagocíticos, avaliou-se a quantidade de taquizoítas aderidos às células, número de células infectadas e a quantidade de taquizoítas intracelulares. Além disso, sobrenadantes de cultura foram coletados para dosagem de citocinas IL-6 e IL-17 por citometric bead array (CBA). A fim de verificar a citotoxicidade dos fármacos em células HeLa, utilizou-se teste colorimétrico sal de tetrazólio MTT(3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio; azul de tiazolilo), onde observou-se que não houve citotoxicidade para as concentrações testadas nesta linhagem celular. Em relação ao pré e pós-tratamento de pravastatina e sinvastatina isoladas foi constatada diminuição nos processos de adesão, invasão e proliferação de *T. gondii* nas células. A secreção de IL-6 e IL-17 nas células HeLa aumentou após infecção com taquizoítas de *T. gondii*, mas ao serem tratadas com pravastatina e sinvastatina isoladas houve redução nos níveis destas citocinas. Ao observar o efeito da pravastatina e sinvastatina associadas à sulfadiazina e pirimetamina, tratamento convencional da toxoplasmose, foi verificada redução significativa tanto nos processos de adesão de *T. gondii* às células HeLa, quanto no número de células infectadas e principalmente no índice de proliferação intracelular do parasito nestas células, em todas as associações testadas. Portanto, concluímos que a pravastatina e sinvastatina isoladas ou em associação com fármacos convencionais apresentaram atividade anti-proliferativa. Neste contexto, nossos dados apresentaram-se promissores para novos estudos com compostos testados no sentido de promover buscas para o tratamento alternativo da toxoplasmose.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*. Células HeLa. Estatinas.

SANFELICE, RAQUEL ARRUDA DA SILVA. **Antiproliferative effect of Pravastatin and Simvastatin on tachyzoites forms of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in HeLa cells.** 2016. 75 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

Toxoplasmosis, infection caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, takes severe form in immunocompromised individuals and in cases of congenital infection. Due to the difficulty in the toxoplasmosis treatment and the toxicity presented by conventional drugs, other compounds have been studied as an alternative treatment for this infection, standing out among them the statins. The statins inhibit cholesterol synthesis processes by enzyme hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase), blocking the conversion of HMG-CoA to mevalonate substrate, inhibiting the initial processes of isoprenoid biosynthesis in human and parasite. In this way, the aim of this study was to evaluate the biological activity of pravastatin and simvastatin isolated or in association with sulfadiazine and pyrimethamine in HeLa cells infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. HeLa cells ( $1 \times 10^5$ ) receive infection with *T. gondii* tachyzoites ( $5 \times 10^5$ ) following two different treatment protocols. First, *T. gondii* tachyzoites were pre-treated for 30 minutes prior to infection and the other protocol the cells were first infected for subsequently, being treated for 24 hours. After the phagocytic tests, it was evaluated the amount of tachyzoites adhered to cells, number of infected cells and intracellular tachyzoites. In addition, the culture supernatants were collected for determination of IL-6 and IL-17 by cytometric bead array (CBA). In order to check the cytotoxicity of drugs in HeLa cells, it was used the colorimetric assay MTT tetrazolium salt (3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl tetrazolium bromide; thiazolyl blue) in which no cytotoxicity to tested concentrations was observed in this cell line. Regarding the pre- and post-treatment of isolated pravastatin and simvastatin, it was found a decrease in adhesion, invasion and proliferation processes of *T. gondii* in the cells. The secretion of IL-6 and IL-17 by HeLa cells increased after the infection with *T. gondii* tachyzoites, but when treated with isolated pravastatin and simvastatin there was a reduction in the levels of these cytokines. When observed the effect of pravastatin and simvastatin associated with sulfadiazine and pirimetamine, the toxoplasmosis conventional treatment, a significant reduction was observed in both *T. gondii* processes of adhesion to HeLa cells, and in the number of infected cells, especially on the index of intracellular parasite, in all associations tested. Therefore, we conclude that isolated pravastatin and simvastatin or in association with conventional drugs showed anti-proliferative activity. In this context, our data demonstrated to be promising for further studies with tested compounds to promote the search for alternative treatment of toxoplasmosis.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*. HeLa cells. Statins.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	20
<b>Figura 2</b> – Estrutura química da pravastatina e sinvastatina inibidoras da enzima HMG-CoA redutase .....	31
<b>Figura 3</b> – Síntese de colesterol pela via do mevalonato e mecanismo de ação das estatinas.....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	– Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	– células apresentadoras de antígenos
APT	– transportador de fosfato do apicoplasto
ATP	– trifosfato de adenosina
DHFR	– enzima diidrofolato-redutase
DMAPP	– dimetilanyl pirofosfato
DNA	– ácido desoxirribonucleico
DOXP	– via 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato
eNOS	– óxido nítrico sintase endotelial
FASII	– biossíntese de ácidos graxos do tipo II
Fc	– receptor de fragmento cristalizado
GRA-1 a GRA-9	– proteínas dos grânulos densos
HDL	– lipoproteínas de alta densidade
HMG-CoA	– enzima hidroximetilglutaril-CoA redutase
IC50	– concentração máxima inibitória
ICAM-1	–
IFN- $\gamma$	– Interferon Gama
IgG	– Imunoglobulina G
IgM	– Imunoglobulina M
IL	– Interleucina
IL-12	– Interleucina -12
IL-17	– Interleucina -17
IL-1B	– Interleucina -1 $\beta$
IL-6	– Interleucina -6
iNOS	– óxido nítrico sintase induzida
IPP	– isopentenil pirofosfato
LDL	– lipoproteínas de baixa densidade
MIC-2	– proteína de micronema tipo 2
MIC-2	– proteína de micronema tipo 2
NADPH	– nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NK	– Natural Killers
nNOS	– óxido nítrico sintase neuronal

NO	– óxido nítrico
NOS	– óxido nítrico sintase
<i>P. falciparum</i>	– <i>Plasmodium falciparum</i>
PABA	– ácido p-aminobenzóico
PBS	– Tampão Salina Fosfato ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCR	– reação em cadeia da polimerase
PCR tempo-real	– reação em cadeia da polimerase
RNA <sup>t</sup>	– ácido ribonucleico transportador
ROPs	– roptrias
SAGs	– antígenos de superfície
<i>T. brucei</i>	– <i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. cruzi</i>	– <i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. gondii</i>	– <i>Toxoplasma gondii</i>
Th1	– T <i>helper</i> 1
Th2	– T <i>helper</i> 2
TNF- $\alpha$	– Fator de Necrose Tumoral alfa
UEL	– Universidade Estadual de Londrina
VLDL	– lipoproteínas de muito baixa densidade
$\alpha$	– alfa
$\beta$	– beta
$\gamma$	– gama
°C	– Graus Celsius
$\mu\text{g}$	– micrograma
$\mu\text{L}$	– microlitro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1	Toxoplasmose .....	12
1.2	Aspectos morfo-biológicos de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	14
1.3	Formas evolutivas e ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	17
1.4	Cepas e polimorfismo genético de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	20
1.5	Resposta imune e diagnóstico da toxoplasmose.....	22
1.6	Terapêutica da toxoplasmose .....	25
1.7	Estatinas .....	29
1.8	Mecanismo de ação e atividade antiparasitária das estatinas .....	32
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
2.1	Objetivo geral .....	36
2.2	Objetivos específicos.....	36
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	<b>53</b>
3.1	<b>ARTIGO 1- Pravastatin and simvastatin inhibit the adhesion, replication and proliferation of <i>Toxoplasma gondii</i> (RH strain) in HeLa cells.....</b>	<b>54</b>
3.2	<b>ARTIGO 2- Proliferation of <i>T. gondii</i> (RH strain) is inhibited by the combination of pravastatin and simvastatin with conventional treatments used in toxoplasmosis .....</b>	<b>63</b>

# 1. INTRODUÇÃO

2

## 1.1. Toxoplasmose

4

5 A toxoplasmose é uma das zoonoses mais conhecidas mundialmente  
6 (ELSHEIKHA, 2008), sendo considerada um problema de saúde pública, pois desenvolve  
7 um quadro preocupante em pacientes imunocomprometidos e em casos de infecção  
8 congênita. Excluindo tais condições, a doença geralmente cursa de forma assintomática  
9 ou benigna em cerca de 90% dos casos (DUMÈTRE et al., 2008; CENCI-GOGA et al.,  
10 2011; CDC, 2015).

11 A toxoplasmose ocorre em dois estágios: fase aguda e fase crônica. Na  
12 fase aguda há predomínio de taquizoítos, que se multiplicam rapidamente e invadem  
13 novas células, diferente da fase crônica há o predomínio de cistos teciduais contendo  
14 bradizoítas no seu interior (DUBEY; JONES, 2008; CENCI-GOGA et al., 2011).

15 Quando a infecção é sintomática, podem ser observadas manifestações  
16 características de fase aguda da infecção, como febre, mialgia, astenia, cefaléia e  
17 linfadenopatia; apesar de raras é possível a ocorrência de encefalite, hepatite e  
18 pneumonia (ELSHEIKHA, 2008; ATILLA et al., 2015). No entanto, nos indivíduos  
19 imunocomprometidos, as manifestações quase sempre ocorrem como resultado da  
20 reativação de cistos pré-existentes. Neste contexto, os bradizoítas voltam ao estágio de  
21 taquizoítos, podendo o paciente evoluir para óbito (DUBEY; JONES et al., 2008; MUNOZ;  
22 LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

23 Além da infecção toxoplásmica primária, pode ocorrer transmissão  
24 transplacentária do parasito por reativação da doença materna crônica causada por  
25 alguma disfunção imunológica (REMYINGTON et al., 2001; KODJIKIAN, 2010). Infecções  
26 anteriores à gestação oferecem um risco muito pequeno para o feto, caso ocorram no  
27 mínimo três meses antes da concepção (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Uma gestante  
28 imunocompetente e com infecção crônica não apresenta risco significativo de transmitir a  
29 infecção para o feto (SENSINI, 2006), mas em raros casos, pode ocorrer, em  
30 consequência à reativação de infecção (VALDÈS et al., 2011) ou reinfeção por cepas de  
31 diferentes genótipos (ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009).

32 A transmissão vertical da toxoplasmose ocorre em 20 a 50% dos casos de  
33 primo infecção. Crianças infectadas podem apresentar microcefalia, hidrocefalia,  
34 calcificação intracranial e coriorretinite, além de retardamento mental e psicomotor

1 (ELSHEIKA, 2008; CARLIER et al., 2012).

2 Estudos experimentais em diferentes espécies de roedores revelaram que  
3 os mecanismos de transmissão e intensidade das lesões resultantes de toxoplasmose  
4 congênita dependem do tempo de gestação, do sítio de infecção e da cepa do parasito  
5 (FERRO et al., 2002; GRUJIC et al., 2005; COSTA et al., 2009).

6 A probabilidade de haver infecção fetal quando a primo infecção materna  
7 ocorre no período preconcepção é de 1%, entretanto se a gestante adquire a infecção no  
8 primeiro ou segundo trimestres gestacionais, a possibilidade da transmissão vertical está  
9 entre 10-20%, porém o comprometimento fetal é mais grave podendo ocasionar aborto.  
10 Caso a infecção ocorra no terceiro trimestre a possibilidade da infecção fetal situa-se  
11 entre 60-90% mas o comprometimento fetal é menor (MONTOYA; LIESENFELD, 2004;  
12 KODJIKIAN, 2010).

13 Casos de comprometimento ocular podem ocorrer durante a fase aguda  
14 ou muitos anos após a doença sistêmica, sendo o intervalo de latência muito variável.  
15 Isso torna difícil o diagnóstico da toxoplasmose ocular pós-natal, já que os casos com  
16 comprometimento ocular na fase inativa da doença podem ser confundidos com infecção  
17 congênita de aparecimento tardio (CORDEIRO et al., 2010). Segundo Frenkel (1949), a  
18 recorrência da retinocoroidite em pacientes com cicatrizes na fase crônica é atribuída à  
19 persistência do estágio latente de infecção nos pseudocistos que, quando rompidos,  
20 liberam material antigênico. A retinocoroidite é considerada o sinal clínico mais frequente  
21 na toxoplasmose crônica em pacientes assintomáticos, além disso a infecção ocular  
22 causada por este protozoário é a maior causa de retinocoroidite, catarata, estrabismo ou  
23 nistagmo e até mesmo cegueira total (SILVEIRA et al., 2015).

24 A prevenção da toxoplasmose é baseada em programas de educação e  
25 saúde pública recomendado, principalmente às gestantes, que evitem contato com  
26 materiais potencialmente contaminados, como carnes cruas ou mal cozidas, frutas e  
27 verduras não higienizadas corretamente (BOJAR; SZYMAŃSKA, 2010). É prudente que a  
28 gestante soropositiva para toxoplasmose também seja orientada a respeito das medidas  
29 profiláticas que devem ser adotadas (ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009).

30 A toxoplasmose apresenta maior incidência em locais quentes, áreas  
31 tropicais de baixas latitudes e de clima seco ou regiões montanhosas. Aproximadamente  
32 25% da população humana global encontra-se infectada pelo parasito (PETERSEN, 2007;  
33 ELSHEIKHA, 2008; GOODSON; DON WINSLOW, 2013).

34 Existem diferenças consideráveis nos índices de prevalência mundial da

1 toxoplasmose devido à fatores como população de gatos existente em determinada  
2 região, condições climáticas, hábitos higiênicos e culturais (MONTROYA; LIESENFELD,  
3 2004; BOYER et al., 2005), condições socioeconômicas (PETERSEN, 2007) e fatores  
4 genéticos do hospedeiro (PEYRON et al., 2003; ELSHEIKHA, 2008; DUBEY et al., 2012).

5 A elevada prevalência da toxoplasmose na França e Itália é atribuída ao  
6 consumo excessivo de carne crua ou mal cozida e na América Central, assim como em  
7 outros países em desenvolvimento, os índices de prevalência da infecção variam de 50 a  
8 80% e devem-se principalmente às condições socio-econômicas e ao clima propício à  
9 sobrevivência do parasito (ELSHEIKHA, 2008; FURTADO et al., 2011; SAADATNIA;  
10 GOLKAR, 2012).

11 Com relação à toxoplasmose congênita, a prevalência varia de 10,3%  
12 para 75,2% em diferentes países, como China, Coréia, Tanzânia e França (LIU et al.,  
13 2009). Já no Brasil, a incidência da toxoplasmose congênita varia de 0,3 a 5,0 a cada  
14 1000 nascimentos (REMINGTON et al., 2001; LOPES-MORI et al., 2009; DUBEY, et al.,  
15 2014; CAPOBIANGO et al., 2014).

## 16 17 18 **1.2. Aspectos morfo-biológicos de *Toxoplasma gondii***

19  
20 *Toxoplasma gondii*, agente etiológico da toxoplasmose, é um protozoário  
21 intracelular obrigatório, capaz de infectar células nucleadas de aves, répteis, anfíbios e  
22 mamíferos, inclusive humanos (LAVINE; ARIZABALAGA, 2007; CENCI-GOGA et al.,  
23 2011). Este parasito pertence ao filo Apicomplexa e à família Toxoplasmatidae (DUBEY et  
24 al., 2012).

25 Este protozoário foi descrito em coelhos no Instituto Biológico de São  
26 Paulo (SPLENDORE, 1908) e no Instituto Pasteur de Tunis, em um roedor do norte da  
27 África, o *Ctenodactylus gondii*, que originou o nome da espécie (PFEFFERKORN, 1990).

28 Morfologicamente, *T. gondii* se assemelha às demais células eucarióticas,  
29 com presença de núcleo, mitocôndrias, complexo golgiense, lisossomos e retículo  
30 endoplasmático. O parasito possui forma alongada com as extremidades arqueadas,  
31 lembrando o formato de uma banana (REMINGTON et al., 2001; ROBERT-GANGNEUX;  
32 DARDÉ, 2012). Além de organelas típicas de organismos eucariontes, *T. gondii* apresenta  
33 organelas características, especialmente envolvidas com os processos de adesão e

1 invasão do parasito à célula hospedeira tais como micronemas, roptrias e grânulos  
2 densos (BLADER; SAEIJ, 2009; BOUCHUT et al., 2014).

3 A adesão de *T. gondii* à célula hospedeira é inicialmente mediada por  
4 proteínas de superfície do parasito, denominadas comumente de antígenos de superfície  
5 (SAGs) (POLLARD et al., 2008; BARRAGAN; BROSSIER; SIBLEY, 2005). Após esse  
6 primeiro contato do parasito com a célula hospedeira, o parasito aumenta seus níveis  
7 intracelulares de cálcio por mecanismos ainda não totalmente conhecidos induzindo a  
8 secreção de proteínas derivadas das micronemas (BLADER; SAEIJ, 2009; HUNTER;  
9 SIBLEY, 2012).

10 Atualmente se conhece 20 tipos de proteínas secretadas pelas  
11 micronemas (ZHOU et al., 2005; BLADER; SAEIJ, 2009), sendo a proteína de micronema  
12 tipo 2 (MIC-2) a melhor estudada até o momento. Barragan, Brossier e Sibley (2005)  
13 demonstraram que a MIC-2 de *T. gondii* se liga a ICAM-1 da célula hospedeira, permitindo  
14 ao parasito migrar até os tecidos imunologicamente privilegiados, como cérebro, retina e  
15 placenta, utilizando-se de uma via paracelular. Esse tipo de deslocamento parasitário  
16 permite a invasão de novos tecidos e, conseqüentemente, a disseminação mais rápida do  
17 parasito no organismo hospedeiro (BARRAGAN; BROSSIER; SIBLEY, 2005; ROBERT-  
18 GANGNEUSE; DARDÉ, 2012).

19 Logo após a adesão de *T. gondii* na célula hospedeira, o parasito inicia  
20 um movimento específico e dependente de actina e miosina denominado “gliding”,  
21 fundamental para a entrada do parasito na célula (BLADER; SAEIJ, 2009).  
22 Posteriormente, ocorre a liberação de proteínas derivadas das roptrias (ROPs) atuando  
23 no transporte do parasito para o interior da célula hospedeira (STRAUB et al., 2009).  
24 Dziadek, Dziadek e Dlugonska (2007) demonstraram um novo atributo das roptrias, ao  
25 relatar que ROP-2 e ROP-4 ligam-se à lactoferrina humana, como um fenômeno capaz  
26 de influenciar no processo de adesão do parasito à célula hospedeira e posterior  
27 replicação intracelular.

28 Os grânulos densos presentes na membrana do parasito são organelas  
29 que descarregam seu conteúdo proteico dentro do vacúolo parasitóforo após a invasão.  
30 As proteínas dos grânulos densos (GRA-1 a GRA-9) possuem diferentes pesos  
31 moleculares e permanecem solúveis no lúmen do vacúolo parasitóforo ou associadas a  
32 ele, garantindo uma fonte de nutrição e impedindo a ligação de lisossomos ao vacúolo  
33 (CARRUTHERS, 2002). Estudos revelaram que *T. gondii* usa GRA-7 para redirecionar o

1 transporte de nutrientes da célula hospedeira em direção ao lúmen do vacúolo  
2 parasitóforo (COPPENS et al., 2006; DESHPANDE et al., 2013). Este processo se dá pelo  
3 redirecionamento dos microtúbulos e filamentos intermediários da célula hospedeira,  
4 garantindo que as organelas do hospedeiro se concentrem nos arredores do vacúolo  
5 parasitóforo (BLADER; SAEIJ et al., 2009).

6 Além das organelas supracitadas, parasitos pertencentes ao filo  
7 Apicomplexa, possuem um plasto secundário não-fotossintético delimitado por cinco  
8 membranas conhecido como apicoplasto. Trata-se de uma organela homóloga aos  
9 cloroplastos de plantas. Acredita-se ter surgido por meio de uma endossimbiose de  
10 células de algas vermelhas que já haviam incorporado uma cianobactéria (HORBACH;  
11 SAHM; WELLE, 1993; Mc FADDEN, 2011). Suas características são semelhantes aos  
12 seus ancestrais procarióticos, com genoma circular, descrito por Piet Borst e  
13 colaboradores (1984), o qual assume uma configuração de cruz, explicado pela presença  
14 de repetições de sequências invertidas, que é marca registrada do DNA dos plastos  
15 (WILLIAMSON et al., 1985).

16 As membranas do apicoplasto constituem um local importante para o  
17 transporte de fontes de carbono usadas nas vias de biossíntese, tais como triose - fosfato  
18 e fosfoenolpiruvato. Elas são translocadas através de um transportador de fosfato do  
19 apicoplasto (APT), o qual é um membro da família de transportadores de fosfato de  
20 plastos. *T. gondii* possui um desses transportadores, o APT1, nas membranas de seu  
21 apicoplasto onde a ablação do gene desse transportador resulta na morte imediata do  
22 parasito (LIM et al., 2010; SEEBER; SOLDATI-FAVRE, 2010; Mc FADDEN, 2011).

23 As funções do apicoplasto consistem em fornecer metabólitos para a  
24 célula, além de ser local de uma série de vias de biossíntese, dentre elas, a biossíntese  
25 de ácidos graxos do tipo II (FASII), a via 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato (via DOXP) para  
26 síntese de isoprenóides e síntese de precursores heme (QIDWAI; KHAN, 2012;  
27 COPPENS, 2013).

28 A via DOXP foi primeiramente descoberta nos cloroplastos de plantas e  
29 algas. Essa via é caracterizada por diferir da via clássica do mevalonato, presente em  
30 animais e fungos, por utilizar um grupo de enzimas totalmente diferentes (SEEBER;  
31 SOLDATI-FAVRE, 2010; LI et al., 2013).

32 A via DOXP é iniciada pela condensação do piruvato com o gliceraldeído-  
33 3-fosfato e consiste em sete reações catalíticas, que levam à síntese de IPP (isopentenil  
34 pirofosfato) e seu isômero DMAPP (dimetilnil pirofosfato). A síntese de IPP é essencial

1 para a sobrevivência de taquizoítos de *T. gondii* (SEEBER; SOLDATI-FAVRE, 2010;  
2 COPPENS, 2013). E embora este parasito seja apto a produzir isoprenóides por via  
3 própria, estes também podem adquirir estes compostos a partir do metabolismo do  
4 hospedeiro que os sintetiza a partir da via do mevalonato (LI et al., 2013).

5 Estudos farmaco-genéticos recentes demonstraram que o apicoplasto é  
6 uma organela essencial para os organismos que o apresentam, uma vez que, sua  
7 eliminação bem como a interferência em seu genoma promove a morte do parasito  
8 (QIDWAI; KHAN, 2012; DE ROCHER et al., 2012). Por estes fatores e também por diferir  
9 das rotas metabólicas características de humanos, o apicoplasto tem se mostrado  
10 importante alvo para a terapêutica de parasitos pertencentes ao filo Apicomplexa.

### 11 12 13 **1.3. Formas evolutivas e ciclo biológico de *Toxoplasma gondii***

14  
15 *T. gondii* possui três formas evolutivas distintas conhecidas por sua  
16 infectividade: taquizoítos, bradizoítas e esporozoítas.

17 Taquizoítos é a forma com característica de rápida proliferação. Possui  
18 estrutura arqueada, medindo aproximadamente 6 µm de comprimento por 2 µm de  
19 largura. O polo anterior é mais afilado e compreende o complexo apical composto por  
20 roptrias, micronemas, conóide e anel polar. Os taquizoítos são vulneráveis aos fatores de  
21 defesa do hospedeiro produzidos pelo sistema imunológico e são estudados como alvos  
22 preferenciais para a escolha, ação e desenvolvimento de medicamentos (MONTROYA;  
23 LIESENFELD, 2004; SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010).

24 Taquizoítos são típicos da fase aguda da infecção, não possuem  
25 predileção por células ou órgãos específicos. São capazes de infectar células fagocíticas  
26 ou não através de um processo que requer energia. Eritrócitos podem ser infectados, no  
27 entanto, nestes o desenvolvimento do parasito não ocorre. Após a invasão na célula  
28 hospedeira, os taquizoítos se multiplicam dentro dos vacúolos parasitóforos a cada quatro  
29 horas aproximadamente, formando rosetas. Com a ruptura celular pelo intenso  
30 parasitismo, as formas invadem outras células ou são fagocitadas (REMINGTON et al.,  
31 2011).

32 O termo *bradys* (lento em grego) foi empregado por Frenkel (1973) para  
33 descrever o organismo que se multiplica lentamente no interior de uma célula hospedeira.  
34 Desta forma, alguns taquizoítos ao penetrarem nas células hospedeiras, proliferam

1 lentamente, desenvolvendo um metabolismo mais lento, formando o cisto tecidual  
2 contendo bradizoítas que morfologicamente diferem pouco dos taquizoítos. Estes cistos  
3 podem atingir 300 µm com até 3000 bradizoítas no seu interior. Tais cistos podem estar  
4 presentes em qualquer tecido do hospedeiro, porém são mais frequentes nos músculos  
5 esquelético e cardíaco, tecido nervoso e região ocular (NISHIKAWA et al., 2011;  
6 SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010). A ruptura de elevado número de cistos é  
7 considerada a expressão de reativação da infecção com subsequente liberação dos  
8 bradizoítas e sua diferenciação para taquizoítos, que proliferarão na vigência de  
9 imunossupressão (REMINGTON et al., 2011).

10 Oocisto é a forma de resistência encontrada no ambiente, a qual contém  
11 esporozoítas, podendo contaminar água, solo e alimentos (AMENDOEIRA, 1995).  
12 Oocistos contendo esporozoítas representam um estágio parasitário altamente infeccioso.  
13 Estes são excretados nas fezes dos felinos após a reprodução sexual no intestino desses  
14 animais (KASPER; BOOTHROYD, 1993) e liberados ainda imaturos (bilhões diariamente)  
15 junto com as fezes. Os oocistos não esporulados são ovais e depois de esporulados ou  
16 maduros são elípticos e medem de 11 a 14 µm. Dependendo da temperatura e  
17 oxigenação, a esporulação ocorre em dois ou três dias, podendo permanecer viáveis por  
18 meses ou anos, conforme condições de temperatura (-20°C a 37,5°C) e umidade  
19 (REMINGTON et al., 2001; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

20 O ciclo biológico de *T. gondii* se processa em duas fases distintas:  
21 assexuada por endodiogenia e sexuada. Os felídeos dos gêneros *Felis* e *Lynx* são os  
22 hospedeiros definitivos onde os protozoários se desenvolvem a etapa assexuada  
23 (merogonia), e também apresentam uma etapa sexuada (gamogonia) do ciclo. Já os  
24 outros animais, como mamíferos e aves, possuem apenas o ciclo assexuado do parasito  
25 e são, portanto, considerados hospedeiros intermediários (DUBEY et al., 2012).

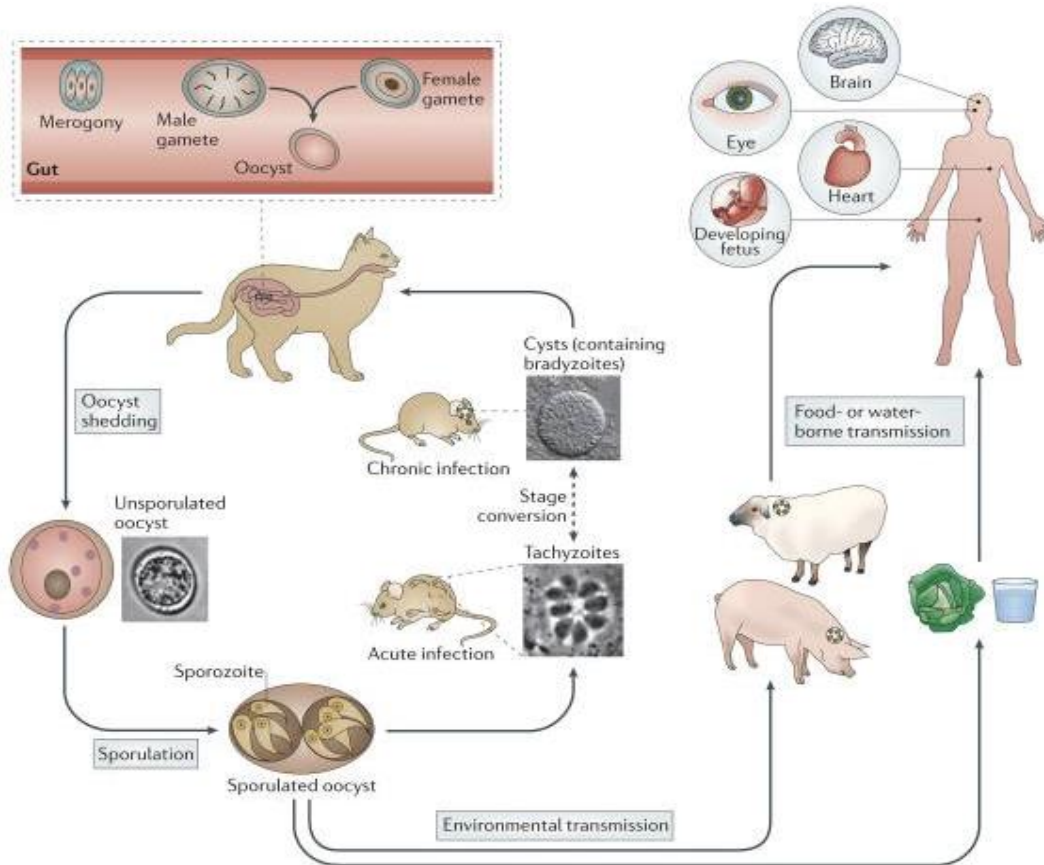
26 Os felídeos podem se contaminar ao ingerir cistos teciduais contendo  
27 bradizoítas, oocistos maduros ou taquizoítos, iniciando a fase enteroepitelial do ciclo no  
28 epitélio do intestino delgado desses animais (KAWAZOE; MINEO: IN NEVES, 2011).  
29 Esses são os únicos animais capazes de eliminar oocisto de *T. gondii* nas fezes. Essa  
30 eliminação ocorre de três a dez dias após a ingestão de cistos teciduais, 18 dias após  
31 ingestão de oocistos e 13 dias após ingestão de taquizoítos. Quando há ingestão de  
32 taquizoítos ou oocistos, cerca de 30% dos gatos passam a eliminar oocistos, no entanto,  
33 aproximadamente 100% dos gatos passam a eliminar oocistos após ingerirem cistos  
34 teciduais (ELSHEIKA, 2008; DUBEY et al., 2012).

1 O ciclo induzido pela ingestão de bradizoítas é o mais conhecido. Após a  
2 ingestão de cistos teciduais pelos felídeos, inicia-se a fase assexuada do ciclo. A parede  
3 do cisto é digerida por enzimas proteolíticas no estômago desses animais, promovendo a  
4 liberação de bradizoítas que penetram nas células do intestino. Nas células epiteliais do  
5 intestino, há o início da etapa assexuada do ciclo, na qual os parasitos começam a se  
6 multiplicar por meio do processo de endodiogenia (merogonia). Há então a formação de  
7 merozoítos no interior do vacúolo parasitóforo, esse conjunto recebe o nome de  
8 esquizonte maduro (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; DUBEY, 2004).

9 A etapa sexuada do ciclo se inicia quando ocorre o rompimento da célula  
10 infectada com conseqüente liberação dos merozoítos. Estes penetram em outras células  
11 epiteliais e se diferenciam em formas sexuadas masculinas e femininas, que após a  
12 maturação formam os gametas femininos imóveis (macrogametas) e masculinos móveis  
13 (microgametas). Os microgametas saem das células e fecundam o macrogameta,  
14 presente em outras células. Depois da fertilização há formação de uma parede externa  
15 envolvendo o zigoto, dando origem ao oocisto imaturo que é liberado para o meio junto  
16 com as fezes dos felídeos. No ambiente com condições ideais de temperatura e umidade  
17 tornam-se esporulados, infectantes (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; HUNTER;  
18 SIBLEY, 2012).

19 Os hospedeiros intermediários, como o homem, por exemplo, adquirem a  
20 infecção pela ingestão de oocistos presentes em água e alimentos contaminados, pela  
21 ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas, pela ingestão de  
22 taquizoítos que podem estar presentes em líquidos biológicos (saliva, leite, esperma); ou  
23 ainda, transplantes de órgãos e infecções transplacentárias (KODJIKIAN, 2010; CENCI-  
24 GOGA et al., 2011; HUNTER; SIBLEY, 2012). Ocorrendo o contato com o parasito, este  
25 sofre intensa multiplicação e penetra em várias células do hospedeiro, local onde o  
26 parasito forma o vacúolo parasitóforo e se multiplica por endodiogenia formando novos  
27 taquizoítos. Estes rompem as células parasitadas e infectam outras células como  
28 demonstrado na figura 1 (HUNTER; SIBLEY, 2012).

29



1

2 **Figura 1.** Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*: O hospedeiro definitivo possui o desenvolvimento sexual  
 3 ocorrendo nas células do intestino delgado, gerando como processo final oocistos. Estes contaminam o  
 4 meio ambiente e após a esporulação podem infectar grande número de hospedeiros por meio da ingestão  
 5 de alimento ou água. Nos hospedeiros intermediários, ocorre apenas o desenvolvimento assexuado de *T.*  
 6 *gondii*, iniciando a fase aguda seguida da fase crônica com formação de cistos teciduais, localizados  
 7 principalmente no cérebro e outros órgãos em pacientes imunocomprometidos, além da infecção congênita  
 8 (HUNTER; SIBLEY, 2012).

9

#### 10 **1.4. Cepas e polimorfismo genético de *Toxoplasma gondii***

11

12 Cepas de *T. gondii* estão amplamente distribuídas na natureza (DUBEY;  
 13 SU, 2009). Os primeiros estudos com cepas foram realizados por regiões geográficas e  
 14 numericamente restritos. Análises moleculares de isolados dispersos principalmente na  
 15 Europa e Estados Unidos, mostram que a maioria das cepas apresenta um padrão  
 16 genético clonal e são pertencentes a um dos três genótipos designados como tipo I, II e III  
 17 (SIBLEY; AJIOKA, 2008; STUTZ et al., 2012).

18 As cepas do tipo I (RH, BK e VEL) estão relacionadas à uma alta  
 19 virulência em camundongos e causam rápida mortalidade no hospedeiro. A cepa RH foi  
 20 isolada em 1939 de uma criança com quadro letal de encefalite toxoplásmica (SABIN,

1 1941) sendo utilizada como padrão na comparação entre cepas. Em camundongos é letal  
2 com uma dose mínima de taquizoítos (DUBEY et al., 1999; DARDÉ, 2008). Em humanos  
3 esta cepa causa doenças oculares graves (VALLOCHI et al., 2005; COMMODARO et al.,  
4 2009).

5 Cepas do tipo II, como ME-49 que foi originalmente isolada da  
6 musculatura de carneiro em 1965, são cistogênicas ou de baixa virulência (SUZUKI et al.,  
7 1988). As cepas do tipo II são predominantes em isolados de pacientes com AIDS e  
8 encefalite toxoplásmica e também se relacionam aos casos de reativação da infecção  
9 crônica em humanos e infecções congênitas (AJZENBERG; COGNE; PARIS, 2002;  
10 SIBLEY et al., 2009).

11 As cepas do tipo III (VEG, M-7741) associam-se às infecções animais e  
12 são responsáveis por infecções brandas e assintomáticas (KIM; WEISS, 2004; SIBLEY et  
13 al., 2009).

14 Desta forma, a patogenicidade de *T. gondii* está estreitamente  
15 relacionada à virulência da cepa e à espécie hospedeira (PENA et al., 2008). Estudo  
16 realizado em Uberlândia, no estado de Minas Gerais permitiu o encontro de dois isolados  
17 em amostras provenientes de coração de galinha caipira (*Gallus gallus domesticus*)  
18 (SALOMÃO, 2007). Posteriormente Franco e colaboradores (2015) denominaram estas  
19 cepas de TgChBrUD1 e TgChBrUD2, onde demonstraram que a cepa TgChBrUD2  
20 apresenta similaridade com a cepa tipo I, enquanto TgChBrUD1 possui similaridades  
21 genéticas com a cepas tipo II. Estes isolados foram capazes de provocar diferenças na  
22 infecção e tempo de rompimento das células. TgChBrUD1 possui multiplicação lenta em  
23 relação à TgChBrUD2.

24 Nos últimos anos, estudos sobre os polimorfismos genéticos e  
25 caracterização genotípica de isolados de *T. gondii* em amostras de diferentes espécies de  
26 animais e humanos de países distintos revelam a diversidade genética deste parasito  
27 (DUBEY et al., 2007; PENA et al., 2008; KHAN et al., 2011). Pela análise de PCR-RFLP  
28 do locus SAG2 (que codifica o antígeno de superfície p22), os isolados encontrados na  
29 América do Norte e Europa apresentam alelos típicos das cepas tipo I, II e III, sendo que a  
30 cepa predominante é do tipo II (SIBLEY et al., 2009). Porém, em isolados oriundos de  
31 outras regiões do mundo, além de Europa e Estados Unidos, observa-se alta  
32 porcentagem de genótipos atípicos ou recombinantes, sugerindo que a população de *T.*  
33 *gondii* seria altamente diversa nessas regiões (DUBEY et al., 2007; SIBLEY; AJIOKA,  
34 2008). Estes resultados corroboram com a pesquisa de Dubey e colaboradores (2007),

1 que demonstrou que as cepas de *T. gondii* do Brasil e Colômbia são biológica e  
2 geneticamente diferentes daquelas da América do Norte e Europa.

3           Acredita-se que a amplitude geográfica e a grande biodiversidade da  
4 fauna do Brasil possam contribuir para essa maior variabilidade genética das cepas  
5 brasileiras de *T. gondii* e que influenciam diretamente na manifestação clínica da doença  
6 (DARDÉ, 2008; KHAN et al., 2011).

### 8 **1.5. Resposta imune e diagnóstico da toxoplasmose**

9  
10           O controle da infecção por *T. gondii* ocorre principalmente pela imunidade  
11 celular, permitindo que o sistema imune do hospedeiro controle a replicação do parasito  
12 (LINDBERG; FRENKEL, 1977; SCHLÜTER et al., 1991). A imunidade mediada por  
13 células é predominante durante a primeira infecção, quando macrófagos, linfócitos T,  
14 células — Natural Killers (NK) e leucócitos polimorfonucleares são funcionalmente ativos  
15 em hospedeiros imunocompetentes (DENKERS; GAZZINELLI, 1998).

16           Quando estabelecida a resposta imune mediada pelas células da  
17 imunidade inata e o conseqüente processamento antigênico no interior de células  
18 apresentadoras de antígenos (APC) como os macrófagos, os linfócitos tornam-se ativados  
19 e passam a secretar citocinas específicas. IFN- $\gamma$  (Interferon Gama) é uma potente citocina  
20 ativadora de macrófagos, que quando ativados produzem óxido nítrico (NO) permitindo  
21 ação tóxica contra o parasito (MILLER et al., 2009; PIFER; YAROVINSKY, 2011). O óxido  
22 nítrico (NO) possui importantes papéis em diversos processos fisiológicos e respostas  
23 inflamatórias, promove o relaxamento da musculatura do endotélio, regulação do sistema  
24 vascular, além de atuar no reparo tecidual, também promove vasodilatação, angiogênese,  
25 re-epitelização e deposição de colágeno (WITTE; BARBUL, 2002; KAPOOR; APPLETON,  
26 2005). No organismo, o óxido nítrico é produzido pela oxidação da L-arginina em L-  
27 citrulina, reação catalisada pelas enzimas NO sintases (NOS) (SHARMA et al., 1992).  
28 Nessa família estão incluídas três isoformas dessa enzima: a endotelial (eNOS), a  
29 neuronal (nNOS) e a induzida (iNOS). Segundo Moncada (1991) a iNOS não é expressa  
30 sob condições normais, é induzida por citocinas e endotoxinas, sendo produzida em uma  
31 variedade de células, incluindo macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos,  
32 hepatócitos, condrócitos, neutrófilos e plaquetas.

33           Altas concentrações de NO são produzidas em resposta a citocinas como  
34 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  durante as infecções parasitárias (BRUNET, 2001). Em infecções

1 por *T. gondii*, NO pode matar diretamente formas taquizoítos inibindo enzimas  
2 mitocondriais e nucleares (BRUNET, 2001). Contudo, essa produção de NO pode ser  
3 danosa ao hospedeiro, contribuindo com o aumento da patologia induzida por citocinas  
4 inflamatórias (MILLER et al., 2009).

5           Como células apresentadoras de antígenos produzem altos níveis de IL-  
6 12 em resposta a alguns antígenos liberados por taquizoítos, essa interleucina estimula  
7 células NK a produzir e secretar altos níveis de IFN- $\gamma$ , o qual induz a diferenciação de  
8 linfócitos T CD4<sup>+</sup> na subpopulação Th1, predominante no curso da infecção por  
9 *Toxoplasma* (ABBAS; LICHTMAN, 2003), no qual citocinas como IFN- $\gamma$  atuam  
10 favorecendo a conversão de taquizoítos em bradizoítas, além de impedir a ruptura de  
11 cistos teciduais, e conseqüentemente inibe a reativação do parasito no hospedeiro  
12 (DENKERS et al., 1997; WANG; KIKUCHI; SUZUKI, 2004). A ativação de macrófagos  
13 cerebrais por IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral alfa) consiste em um mecanismo  
14 de defesa do cérebro contra *T. gondii* (MILLER et al., 2009; SILVA; LANGONI, 2009;  
15 MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

16           Já a IL-2, citocina pró-inflamatória, auxilia no recrutamento de novos  
17 linfócitos TCD4<sup>+</sup> promovendo a ativação de células TCD8<sup>+</sup> ou células citolíticas, que  
18 produzem enzimas proteolíticas (granzimas e perforinas), capazes de romper a  
19 membrana de parasitos livres ou células infectadas pelo mesmo (SUBAUSTE; KONIARIS;  
20 REMINGTON, 1991). Além da subpopulação Th1, a subpopulação de linfócitos Th17  
21 também parece ter papel importante na resposta imune contra *T. gondii*. IL-17 é a  
22 principal citocina responsável pelo recrutamento e desenvolvimento de neutrófilos, os  
23 quais eliminam grande quantidade de parasitos durante as fases iniciais de infecção. A  
24 deficiência de IL-17 em camundongos mostrou atividade inicial anti-*T. gondii* prejudicada,  
25 levando à incapacidade da resposta imune adaptativa em controlar a carga parasitária e  
26 subsequente, aumento da mortalidade (KELLY et al., 2005; GUITON et al., 2010). Além  
27 disso, IL-17 estimula a produção de IL-6 que em associação com o óxido nítrico, amplifica  
28 a resposta inflamatória local em sinergia com outros mediadores (AFZALI et al., 2007).

29           A resposta imune humoral ao *T. gondii* apresenta atuação menos direta  
30 no controle da infecção. A classe de anticorpos IgM é a primeira a aparecer no início da  
31 infecção pelo parasito. Esses anticorpos são típicos da fase aguda ou recente, todavia,  
32 podem permanecer detectáveis no soro humano por anos, se usadas técnicas de alta  
33 sensibilidade (TAKAHASHI; ROSSI, 1997). Anticorpos IgG são característicos da fase  
34 crônica da toxoplasmose. Suas funções incluem a citotoxicidade dependente de

1 anticorpo, quando receptores para a porção Fc de IgG está presente na superfície celular  
2 de macrófagos e células NK e a ativação da via clássica do sistema complemento. Esses  
3 anticorpos alcançam um título máximo e declinam gradualmente em alguns meses a anos  
4 (FILLISETTI; CANDOLFI, 2004).

5 A detecção de diferentes perfis de anticorpos é importante no diagnóstico  
6 da toxoplasmose. O diagnóstico da toxoplasmose pode ser clínico ou laboratorial. O  
7 diagnóstico clínico não é fácil de se realizar pois os casos agudos podem ser apenas  
8 febre, cansaço e linfadenopatia evoluindo para a forma crônica. Geralmente a  
9 toxoplasmose é assintomática ou então se assemelha a outras doenças, sendo assim a  
10 suspeita clínica deverá ser confirmada por meio de diagnóstico laboratorial, que é mais  
11 frequente por meio de testes sorológicos que indicam a presença de anticorpos  
12 circulantes caracterizando a fase da infecção (GOODSON; DON WINSLOW, 2013).

13 A reação imunofluorescência indireta, é um dos testes de referência para  
14 toxoplasmose, sensível e seguro para a diagnóstico da infecção, podendo ser usado tanto  
15 na fase aguda (com presença de anticorpos da classe IgM) quanto na fase crônica  
16 (presença de anticorpos da classe IgG) da doença. Este diagnóstico pode ser detectado  
17 com oito a dez dias após o início da infecção humana, os anticorpos específicos já podem  
18 ser detectados e, dependendo de suas características imunológicas, poderá indicar a  
19 toxoplasmose aguda (EMELIA et al., 2014).

20 O teste Imunoenzimático ELISA é um dos mais utilizados. Este permite  
21 desde uma simples triagem inicial da toxoplasmose até a determinação da fase de  
22 infecção com alta eficiência (GOODSON; DON WINSLOW 2013; EMELIA et al., 2014).  
23 Vale ressaltar a importância do ELISA-avidez no diagnóstico. O teste de avidez de  
24 anticorpos IgG analisa a força de ligação do complexo formado antígeno-anticorpo. Na  
25 fase aguda da doença, uma vez que a síntese de anticorpos é recente, a ligação do  
26 complexo antígeno-anticorpo é facilmente dissociável, concluindo que a IgG tem reduzida  
27 avidez pelo antígeno. Já na fase crônica, formam-se complexos antígeno – anticorpo de  
28 difícil dissociação, representando resultado com IgG de elevada avidez (LEÃO;  
29 MEIRELES-FILHO; MEDEIROS, 2004; TANIMURA et al., 2015).

30 Existe a necessidade de estimar o tempo de ocorrência da infecção, no  
31 caso de mulheres grávidas que têm IgM e provável infecção aguda, o teste de avidez de  
32 IgG é aconselhável. A infecção é considerada recente (três meses ou menos) quando a  
33 porcentagem de anticorpos IgG com baixa avidez for <30% e correlacionada com o  
34 aumento do risco da infecção fetal. O diagnóstico em recém-nascidos é realizado através

1 da detecção de IgG e/ou IgA e/ou presença de IgG em níveis crescentes ou positividade  
2 persistente em 12 meses da vida da criança. Anticorpos IgM não atravessam através da  
3 placenta e são considerados marcadores congênitos da infecção (GOODSON; DON  
4 WINSLOW, 2013).

5 Técnicas moleculares (reação em cadeia da polimerase, PCR tempo-real)  
6 apresentam-se como método mais sensível, e tem se mostrado útil em várias aplicações,  
7 incluindo a detecção de DNA do parasito, pois a amplificação dos ácidos nucleicos  
8 permite a detecção mínima da quantidade do DNA alvo mesmo na presença de altas  
9 concentrações do DNA do hospedeiro ou de outros organismos coinfectantes  
10 (FERRREIRA; ÁVILA, 2001).

11 Para a toxoplasmose ocular, são pesquisados anticorpos no humor  
12 aquoso ou no vítreo, esses anticorpos podem ser detectados pelo teste Immunoblot com  
13 reatividade para bandas antigênicas diferentes do que para o soro e outra possibilidade  
14 de detecção de *Toxoplasma* intraocular seria pela identificação de DNA parasitário pela  
15 PCR (FERRREIRA; ÁVILA, 2001).

## 16

## 17

## 18 **1.6. Terapêutica da Toxoplasmose**

19  
20 Uma droga ideal para o tratamento da infecção por *T. gondii* deve  
21 apresentar propriedades parasitocidas contra os diferentes estágios do parasito,  
22 distribuição nos sítios principais de infecção fetal e total isenção de toxicidade fetal e de  
23 efeitos teratogênicos. No entanto, nenhuma droga atualmente utilizada no tratamento  
24 humano da toxoplasmose apresenta todos esses critérios (DEROUIN et al., 2000;  
25 ELSHEIKHA, 2008; BARBOSA et al., 2015).

26 As drogas utilizadas no controle da toxoplasmose podem ser agrupadas  
27 nas seguintes categorias: Antagonistas de Folato. Essas drogas inibem a síntese de  
28 enzimas que participam da via da síntese de folato, impedindo a duplicação do DNA  
29 celular em estágio agudo da infecção. Nesse grupo estão incluídas as drogas  
30 pirimetamina, trimetropim e sulfadiazina, que possuem efeito sinérgico. O uso combinado  
31 de pirimetamina e sulfadiazina é aprovado como tratamento de escolha para a  
32 toxoplasmose desde 1950. Seu uso combinado é oitenta vezes mais efetivo que a  
33 utilização das drogas separadamente. Entretanto, a sulfadiazina não é bem tolerada pelo  
34 organismo, apresentando efeitos adversos, principalmente supressão de atividade da

1 medula óssea (PETERSEN, 2007). Além de ser necessária a concomitante administração  
2 de ácido fólico, principalmente em pacientes grávidas (MONTROYA; LIESENFELD, 2004;  
3 MARTINS-DUARTE et al., 2006).

4 A sulfadiazina é um derivado das sulfonamidas, apresenta-se em forma  
5 de sólidos brancos, cristalinos, hidrossolúveis, podendo ser administradas via oral,  
6 parenteral, retal ou tópica. Uma vez absorvida, se distribuem por todos os tecidos e  
7 líquidos do organismo podendo ser encontradas variadas concentrações destes fármacos  
8 na bile, sucos digestivos, líquido pleural. Atravessam facilmente a placenta, atingindo a  
9 circulação fetal e, em menores quantidades, o leite materno. A atividade farmacodinâmica  
10 deste medicamento se deve ao fato de serem análogos estruturais do ácido p-  
11 aminobenzóico (PABA). Através da inibição competitiva, as sulfonamidas impedem a  
12 incorporação do ácido p-aminobenzóico durante a biossíntese do ácido diidropteróico,  
13 funcionando dessa forma como antimetabólito. A aplicação clínica desse antimetabólito  
14 fundamenta-se em sua toxicidade seletiva sendo mais tóxico para o micro-organismo que  
15 para o homem (SILVA, 1998; GOBEL et al., 2007).

16 A enzima diidrofolato-redutase (DHFR) é um alvo clássico na  
17 quimioterapia antiparasitária, bastante utilizada no combate à protozoários como  
18 *Plasmodium spp* e *T. gondii*. A pirimetamina atua inibindo ativamente a DHFR nesses  
19 animais (GOOLDMAN; GILMAN, 2001).

20 As enzimas DHFRs convertem o ácido diidrofólico em ácido  
21 tetraidrofólico, um processo que leva à síntese de purinas e, por fim, de DNA. A  
22 associação de pirimetamina e sulfadiazina produz bloqueio sequencial dessa etapa  
23 metabólica, resultando em aumento acentuado (sinergismo) da atividade de ambos os  
24 fármacos (KATZUNG, 2006).

25 O uso da pirimetamina frequentemente está associado a outros fármacos  
26 principalmente no tratamento da malária, evitando assim o aparecimento de resistência.  
27 Atua como inibidor da biossíntese dos ácidos nucleicos. Entretanto, é pouco empregada  
28 na terapêutica por ser altamente tóxica, pois interage indistintamente com os processos  
29 bioquímicos tanto do parasito quanto do hospedeiro. A pirimetamina é absorvida  
30 lentamente no trato gastrointestinal, e após absorção, liga-se, em alta proporção, às  
31 proteínas plasmáticas, sendo parcialmente biotransformada em diversos metabólitos. É  
32 distribuída para vários órgãos concentrando-se sobretudo nos rins, fígado, pulmão, baço e  
33 células sanguíneas. Pode ser excretado nas fezes, urina e até no leite materno (SILVA,  
34 1998; KATZUNG, 2006).

1 A pirimetamina pode ser teratogênica e por isso seu uso não é  
2 recomendado durante os primeiros meses de gravidez (DEGERLI et al., 2003). Produz  
3 efeitos adversos previsíveis de um fármaco antifolato, em particular a supressão da  
4 medula óssea, podendo ocasionar anemia megaloblástica, leucopenia e granulocitopenia  
5 (KATZUNG, 2006). Diante disso, o efeito teratogênico da pirimetamina pode ser inibido  
6 através da administração de ácido fólico em gestantes com infecção fetal congênita  
7 (KATZUNG, 2006).

8 Apesar de todos os prováveis efeitos tóxicos, ainda é indicada em casos  
9 de infecção fetal a combinação das drogas sulfadiazina-pirimetamina e ácido fólico  
10 (GRUJIC et al., 2005). O uso desta associação de drogas pode reduzir o risco de  
11 toxoplasmose congênita em até 70%, pois estes antibióticos agem sinérgica e  
12 eficientemente, cruzam a barreira placentária e previnem a progressão dos danos ao feto  
13 (BOYER et al., 2005).

14 Outra classe de medicamentos utilizados na toxoplasmose são os  
15 macrolídeos que apresentam efeito tóxico ao parasito através da ligação a açúcares e  
16 inibem a síntese proteica deste. Os macrolídeos mais comuns utilizados contra a  
17 toxoplasmose são espiramicina, clindamicina e a azitromicina que está em fase de estudo  
18 (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; COSTA et al., 2009). A espiramicina possui atividade  
19 toxoplasmicida intracelular e capacidade de atravessar a barreira placentária sendo capaz  
20 de retardar a transmissão do parasito, promovendo redução na severidade da infecção  
21 fetal, por isso é indicada quando apenas a mãe é infectada (REMINGTON et al., 2001;  
22 KATZUNG, 2006). No entanto, ainda não são elucidados os efeitos desse medicamento  
23 em fetos (GRUJIC et al., 2005; ELSHEIKHA, 2008). Por ser um antibiótico do grupo dos  
24 macrolídeos, possui espectro antibactericida comparável à eritromicina (REMINGTON et  
25 al., 2001).

26 A espiramicina não é indicada para o tratamento da toxoplasmose ocular,  
27 sendo a clindamicina o tratamento de escolha para esse caso. Esta é utilizada combinada  
28 à pirimetamina em pacientes que são sensíveis a sulfadiazina (MONTROYA; LIESENFELD,  
29 2004; ABDALLAH et al., 2009).

30 Foi comprovado que azitromicina também pode inibir o crescimento de  
31 taquizoítos de *T. gondii in vitro e in vivo*. Esse medicamento atua inibindo a síntese  
32 proteica do parasito, porém o sítio de ação e fixação da droga no parasito não foi ainda  
33 demonstrado. Em estudo da toxoplasmose aguda foi observado que a azitromicina tem  
34 seus efeitos potencializados quando combinada com pirimetamina ou sulfadiazina, juntos,

1 esses medicamentos apresentaram resultados promissores no tratamento da  
2 toxoplasmose (COSTA et al., 2009; CASTRO-FELICE et al., 2014)

3 Já as hidroxinaftoquinonas são drogas muito utilizadas no controle de  
4 parasitos do gênero *Plasmodium* e os efeitos tóxicos ao parasito são devido à inibição na  
5 sua cadeia respiratória (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

6 Seu uso é restrito aos adultos, não sendo aprovado ainda para infecção  
7 materno-fetal ou em crianças (CORTINA-BORJA et al., 2010). Entretanto, este  
8 medicamento em modelos murinos apresentou efeito protetor contra toxoplasmose  
9 congênita e evitou complicações inflamatórias (OZ; TOBIN, 2012).

10 Sabe-se que parasitos do filo Apicomplexa dependem da cadeia de  
11 transporte de elétrons para regenerar a di-hidroxo-orotato redutase oxidada. Desta forma,  
12 o tratamento com atovaquona interrompe a síntese de pirimidinas e, por conseguinte,  
13 impede a replicação do DNA destes protozoários (IVERS; RYAN, 2014).

14 Segundo Dunay e colaboradores (2004), a atovaquona mostrou-se  
15 superior quando associada a pirimetamina e sulfadiazina ou na associação de  
16 pirimetamina com clindamicina para a inibição de inflamações cerebrais e para a  
17 severidade da infecção em camundongos por *T. gondii*, mesmo sendo casos de infecção  
18 aguda, crônica ou de reativação da doença (DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ et al., 2002).

19 Além dos fármacos citados acima tem-se as fluoroquinolonas, como  
20 gatifloxacina e travafloxacina que impedem a proliferação do parasito devido à inibição de  
21 enzimas envolvidas na replicação do DNA, e tem sido usado no tratamento experimental  
22 contra *T. gondii* (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

23 Diante da gravidade e dificuldade no tratamento da toxoplasmose, são  
24 necessárias pesquisas que investiguem o potencial terapêutico de compostos alternativos  
25 para esta infecção.

26 As estatinas apresentam bons resultados para algumas infecções  
27 parasitárias experimentais. *T. gondii* é incapaz de sintetizar esteróis pela via do  
28 mevalonato, mas o incorpora do hospedeiro e posteriormente metaboliza colesterol  
29 durante a infecção para síntese de membrana, principalmente do vacúolo parasitóforo,  
30 local exclusivo para sua replicação. Sabendo que as estatinas bloqueiam a síntese do  
31 mevalonato em humanos e que também atuam no sentido de prevenir a síntese de  
32 importantes isoprenóides intermediários da via biossintética do colesterol, estudos com  
33 estes fármacos constituem atrativos promissores na terapêutica da toxoplasmose.

## 1 1.7 Estatinas

2

3

4

5

6

7

As estatinas apontaram um novo caminho na terapia hipolipemiante por se tratarem de substâncias com elevada eficácia na redução plasmática de colesterol auxiliando assim, na prevenção primária e secundária de doenças cardiovasculares sendo, portanto, consideradas as drogas de escolha no tratamento da hipercolesterolemia atualmente (GARCIA-SABINA et al., 2012).

8

9

10

11

12

As estatinas exibem semelhanças em sua estrutura básica e em seu mecanismo de ação, entretanto, diferenças nos substituintes podem levar a perfis farmacocinéticos distintos. As maiores diferenças estão na lipofilicidade, que tem influência na posição que as estatinas ocuparão nas membranas celulares e na via hepática de metabolização (GOLAN, 2009).

13

14

15

16

17

18

19

Mevastatina foi a primeiro inibidor de HMG-CoA redutase a ser descoberto graças ao cientista Akira Endo e colaboradores em 1976, originalmente isolado como produto metabólico de cultura de *Penicillium citrinium*. Mas a primeira estatina disponível e comercializado como um medicamento foi a lovastatina, que foi isolada posteriormente de cultura de *Aspergillus terreus* com estrutura semelhante à mevastatina, mas com potência superior (CAMPO; CARVALHO, 2007; ENDO; KURODA; TANZAWA, 1976).

20

21

22

23

Até o momento, existem seis estatinas comercializadas, a lovastatina, sinvastatina, pravastatina, atorvastatina, fluvastatina e rosuvastatina. As três primeiras são de origem natural, produzidas por fungos *Aspergillus terreus*, as restantes, são sintéticas (GARCIA-SABINA et al., 2012).

24

25

26

27

28

29

30

Independente de sua origem, todas as estatinas possuem em comum o ácido heptenóico como grupo farmacofórico, o qual mimetiza o mevalonato que é o substrato natural da enzima hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase. Essa estrutura permite que a droga atue como inibidor competitivo desta enzima. A sinvastatina é um 2,2-dimetil butirato análogo da lovastatina, em que um grupo metil foi adicionado enquanto a pravastatina foi obtida, de cultura dos fungos *Nocardia autrophica* (MASON, 2006; GOLAN, 2009).

31

32

33

34

No grupo derivado de fungos, há um anel decalina ligado à porção similar à HMG, enquanto que nas drogas sintéticas, tem-se um anel pirimidínico central ligado a grupos fluorofenil e metiletil. Isso interfere na ligação ao sítio de ação, pois além das interações iônicas presentes em todas as estatinas, podem ocorrer interações adicionais

1 com resíduos de aminoácidos da HMG-CoA redutase. Esses grupos volumosos  
2 contribuem para um impedimento estérico no sítio, dificultando ainda mais a ligação da  
3 enzima ao substrato. Além disso, essas estruturas cíclicas conferem o caráter lipofílico  
4 das drogas, por serem estruturas apolares e hidrofóbicas (KATZUNG, 2006).

5 O impacto que a lipofilicidade traz às estatinas está no fato de interferir na  
6 difusão das moléculas nas bicamadas fosfolipídicas das membranas celulares uma vez  
7 que a HMG-CoA redutase é uma proteína associada à membrana localizada no retículo  
8 endoplasmático liso e diferenças nas interações com a membrana podem influenciar em  
9 sua capacidade de inibir a enzima e seu metabolismo. Dessa forma, estatinas mais  
10 hidrofílicas, como a pravastatina, situam-se na superfície polar e necessitam de  
11 transporte ativo para serem tomadas pelos hepatócitos, enquanto que as mais lipofílicas  
12 transpõem a bicamada lipídica por difusão passiva e se distribuem para outros tecidos  
13 sem especificidade. Como resultado, os valores de concentração máxima inibitória (IC50)  
14 para a pravastatina são muito maiores em relação aos da sinvastatina (MASON, 2006;  
15 GOLAN, 2009).

16 Outro fator fundamental é a forma de administração da droga, que pode  
17 ser na forma farmacologicamente ativa ou inativa (pró-fármaco). Um pró- fármaco é  
18 aquele que necessita passar por alterações metabólicas para ser liberado em sua forma  
19 ativa (fármaco). Essa estratégia é usada para facilitar a biodisponibilidade oral, diminuir a  
20 toxicidade gastrointestinal e prolongar a meia-vida de eliminação de um fármaco. Com  
21 exceção da lovastatina e sinvastatina, que são administradas como pró-fármacos, as  
22 demais estatinas são administradas na forma ativa como sal de sódio. Ambas são  
23 rapidamente absorvidas e atuam primariamente no fígado, para onde são transportadas.  
24 Isso permite a incorporação ao tecido hepático para a biotransformação. Por ter um  
25 extenso metabolismo hepático, a biodisponibilidade sistêmica é relativamente baixa,  
26 variando de 5 a 25%, que também é afetada pela alta ligação a proteínas plasmáticas,  
27 como a albumina. A pravastatina, em contraste aos outros inibidores da HMG-CoA  
28 redutase, não se liga à albumina e seu metabolismo não é predominantemente catalisado  
29 pelas 35 isoenzimas do citocromo P450. Portanto, não exhibe dependência desse sistema,  
30 sendo as reações de fase II e degradação pelo ácido gástrico mais importantes para sua  
31 eliminação (KATZUNG, 2006).

32 Estatinas são, habitualmente, bem absorvidas no trato gastrintestinal e  
33 atingem rapidamente o pico máximo de concentração plasmática. Após absorção  
34 intestinal, estas são captadas e metabolizadas pelo fígado e excretas basicamente junto

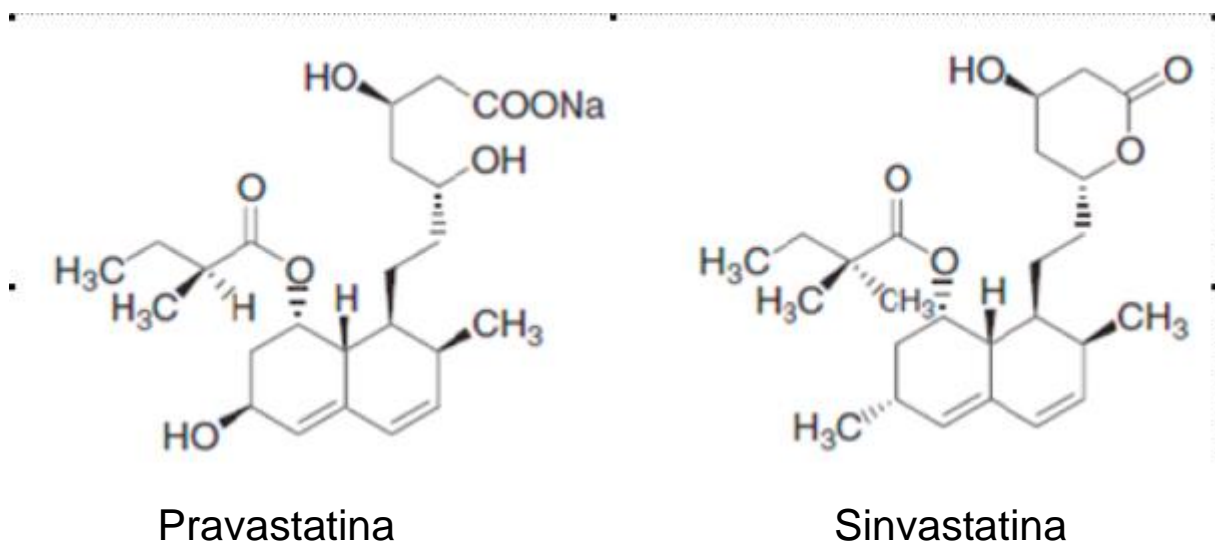
1 às fezes e em pequena percentagem, pela urina (GOLAN, 2009).

2 A diferença funcional entre estatinas naturais e sintéticos baseia-se na  
3 sua capacidade para interagir e inibir a HMG-CoA redutase e sobre a sua lipofilicidade.  
4 Dois tipos de estatinas são conhecidos por formar mais interações com os inibidores da  
5 HMG-CoA redutase devido às suas características estruturais; por exemplo, atorvastatina  
6 e rosuvastatina apresentam interações de ligação de hidrogênio adicionais. A  
7 rosuvastatina também exibe uma interação polar entre o grupo sulfonamida de metano e  
8 a enzima HMG-CoA redutase. Estas propriedades estruturais tornam esta estatina mais  
9 eficiente por reduzir a atividade da HMG-CoA em 50% (GAZZERRO et al., 2012).

10 A pravastatina é a única estatina não ligada às proteínas  
11 plasmáticas, assim, como resultado de uma exposição sistêmica à droga não ligada, o  
12 fármaco é ativo, mas apresenta uma ação relativamente baixa (CORSINI et al., 1999;  
13 KOCIJAN et al., 2005) e o seu nível de circulação é elevado em comparação com outras  
14 estatinas (HAMELIN; TURGEON, 1998; GAZZERRO et al. 2012).

15 Sinvastatina e lovastatina têm o maior potencial para interações  
16 clinicamente relevantes, seguidos de atorvastatina (JACOBSON, 2004).

17 A pravastatina é um composto ativo na forma estrutural de anéis abertos e  
18 a sinvastatina são pró-fármacos, sendo ativada apenas *in vivo*, depois de metabolizados  
19 para a forma estrutural de anel aberto. Esses fármacos apresentam efeitos metabólicos  
20 muito semelhantes, ainda que haja entre eles, várias diferenças estruturais moleculares  
21 (Figura 2) (WERMUTH, 1996; KOCIJAN, et al., 2005).



24 **Figura 2.** Estrutura química da pravastatina e sinvastatina inibidoras da enzima HMG-CoA redutase  
25 (WERMUTH, 1996).

## 1.8 Mecanismo de ação das estatinas e atividade antiparasitária

A fim de melhor entendimento do mecanismo de ação das estatinas, é necessário a compreensão do processo de síntese do colesterol, substância essencial na estrutura de muitas membranas, além de ser precursor da vitamina D, de muitos hormônios esteroides e dos ácidos biliares (MASON, 2006).

O colesterol é sintetizado no retículo endoplasmático seguindo as vias enzimáticas do mevalonato e hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) redutase e posteriormente, utilizado para biogênese da membrana celular ou para síntese dos derivados de colesterol. Lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade são importante fonte de colesterol, estes são internalizados por meio de receptores específicos (NISHIKAWA et al., 2011).

O passo inicial na biossíntese do colesterol consiste na condensação de três moléculas de acetil-CoA para a formação do hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA). A redução do HMG-CoA em mevalonato através da HMG-CoA redutase envolve a doação de dois elétrons de duas moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e caracteriza a etapa decisiva da síntese. A enzima HMG-CoA redutase é uma proteína integral de membrana do retículo endoplasmático liso. O mevalonato, então, é convertido em dois isoprenos ativados, o isopentil pirofosfato (IPP) e o dimetil pirofosfato (DMAPP) com a utilização de três moléculas de adenosina trifosfato (ATP). Estes são condensados para formar outros compostos isoprenóides que culminarão na formação do esqualeno, essencial na formação do colesterol, que ainda possui estrutura linear. A etapa final consiste na conversão do lanosterol em colesterol em uma série de vinte reações que incluem metilações e desmetilações (CHRISTIANS; JACOBSEN; FLOREN, 1998; COPPENS, 2013).

Para que o colesterol formado desempenhe suas funções é preciso que haja o transporte deste e de seus ésteres do tecido de origem através do plasma sanguíneo para o tecido onde serão consumidos ou armazenados. Esse transporte é realizado por meio de lipoproteínas plasmáticas, que são complexos moleculares de proteínas transportadoras, as apolipoproteínas, com combinações de fosfolipídios, colesterol, ésteres de colesterol e triacilgliceróis (CORTESE; LIBERATOSCIOLI, 2003).

Entre os principais tipos de lipoproteínas estão os quilomícrons, as VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade), HDL (lipoproteínas de alta densidade) e LDL (lipoproteínas de baixa densidade), sendo esta a de maior preocupação em casos de

1 doenças já que sua constituição inclui grande quantidade de colesterol e ésteres de  
2 colesterol. Sua principal função é transportar colesterol para tecidos periféricos,  
3 entretanto, se as LDL não forem suficientemente retiradas da circulação sanguínea, ou se  
4 estiverem em excesso, culminam no acúmulo de colesterol nas paredes de vasos,  
5 obstruindo-os e resultando, por vezes, em aterosclerose (CORTESE; LIBERATOSCIOLI,  
6 2003; SHITARA; SUGIYAMA, 2006).

7 Basicamente o processo normal de captação e retirada das LDL  
8 plasmáticas é realizado por meio do reconhecimento da apolipoproteína apoB-100 por  
9 receptores específicos de superfície, os receptores de LDL, que estão expressos nos  
10 hepatócitos, nos macrófagos, nas células adrenocorticais, células gonadais e células  
11 musculares lisas. Uma vez ligada a seu receptor, é iniciado um processo de endocitose,  
12 com formação de um endossomo, composto pela LDL e seu receptor, que se funde a um  
13 lisossomo. As enzimas presentes nessa organela lisam os ésteres de colesterol, liberando  
14 colesterol e ácidos graxos no citosol, cujo destino é ser reesterificado para  
15 armazenamento no interior de gotículas lipídicas ou ser incorporado nas membranas.  
16 Normalmente, as LDL se ligam fracamente ao seu receptor específico, e isso determina a  
17 prolongada meia-vida destas no plasma sanguíneo (2 a 4 dias) representando cerca de  
18 65 a 75% do colesterol plasmático total (GOLAN, 2009).

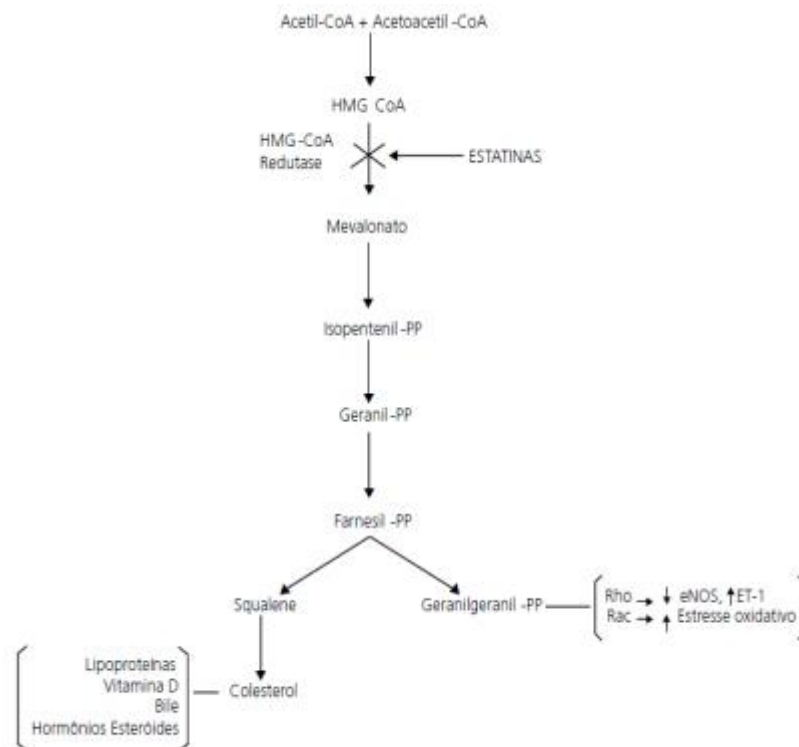
19 Devido a esses riscos e problemas associados aos altos níveis de  
20 colesterol sanguíneo a partir dos anos 60, pesquisas de âmbito fármaco-biológico foram  
21 empreendidas e assim, em meados de 1973, o surgimento das estatinas possibilitou  
22 redução da mortalidade em decorrência deste quadro e, conseqüentemente, melhor  
23 qualidade de vida à população (GARCIA-SABINA et al., 2012).

24 O mecanismo de ação das estatinas consiste em promover a redução da  
25 síntese de colesterol nos hepatócitos mediante a inibição da enzima HMGCoA redutase  
26 impedindo a transformação da HMG-CoA em ácido mevalônico. Esta redução da  
27 concentração intracelular de colesterol LDL, associada ao aumento na expressão de  
28 receptores para colesterol na superfície dos hepatócitos, promovem maior extração de  
29 LDL do sangue circulante, diminuindo a concentração do mesmo (GARCIA-SABINA, et  
30 al., 2012).

31 Além disso, as estatinas apresentam efeitos adicionais sobre o perfil  
32 lipídico uma vez que aumentam a concentração de colesterol HDL e diminuem os níveis  
33 de triglicerídeos. Por meio de mecanismos de ação secundários, reduzem ainda, os níveis  
34 de proteínas aterogênicas e lipoproteínas ricas em triglicerídeos. Com isso, também

1 exercem efeitos benéficos em nível cardiovascular de forma independente de suas  
2 propriedades modificadoras do metabolismo lipídico (GARCIA-SABINA, et al., 2012).

3 Desta forma, pode-se dizer que as estatinas, em geral, produzem o seu  
4 efeito hipocolesteremiante por dois mecanismos: inibição reversível da atividade da  
5 HMG-CoA redutase e inibição da produção de lipoproteínas de baixa densidade – LDL –  
6 através da diminuição da síntese hepática das lipoproteínas de muito baixa densidade –  
7 VLDL – suas precursoras (SCHACHTER, 2005). Além disso, as estatinas promovem  
8 melhora da função de células endoteliais, redução e proliferação de células musculares  
9 lisas (GARCIA-SABINA, et al., 2012). A figura 3 mostra a via de inibição das estatinas na  
10 síntese de colesterol.



11 **Figura 3.** Síntese de colesterol pela via do mevalonato e mecanismo de ação das estatinas. Atividade  
12 inibidora das estatinas ocorre sobre a enzima HMG-CoA redutase, bloqueando a conversão do substrato  
13 HMG-CoA em mevalonato, inibindo assim os processos iniciais da biossíntese de isoprenóides e  
14 consequentemente de colesterol. Adaptado de Liao & Laufs, 2005.

16 Além das funções citadas, segundo Kückelhaus e colaboradores (2013),  
17 as estatinas promovem alteração da resposta inflamatória. Trabalho realizado pelos  
18 mesmos analisando a evolução de lesões cutâneas em animais infectados com  
19 *Leishmania amazonensis* submetidos ao tratamento com pravastatina, demonstrou o  
20 efeito microbicida da droga sobre o parasito, além de observarem que a mesma foi capaz  
21 de diminuir a intensidade das reações inflamatórias por meio do bloqueio da indução de  
22 INF- $\gamma$ . De acordo com os autores, as estatinas favorecem um padrão de resposta perfil

1 Th2 anti-inflamatório, no entanto, foi comprovado também que estas são capazes de  
2 promover um efeito pro-inflamatório em paralelo uma vez que estimulam a produção de  
3 citocinas IL-18 e IL-1 pelos monócitos do sangue periférico e  $TNF\alpha$  pelos macrófagos e  
4 conseqüentemente esses efeitos contribuem para o aumento na produção de óxido nítrico  
5 favorecendo a eliminação do parasito e imunomodulando, assim, a resposta inflamatória,  
6 minimizando danos teciduais e prolongando a vida do hospedeiro (MONICK et al., 2003).

7 Algumas estatinas apresentam efeito tóxico sobre outros parasitos.  
8 Lovastatina, por exemplo, inibe o crescimento e a biossíntese de esteroides essenciais  
9 para *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei* (FLORIN-CHRISTENSEN et al., 1990; COPPENS et  
10 al., 1995). Além disso, Chen, Foster e Bennét (1990) demonstraram que HMGCoA é vital  
11 para a sobrevivência de *Schistosoma mansoni in vitro* e o uso de inibidores dessa enzima  
12 promove redução na mobilidade do parasito e também, sua morte.

13 A ação antiparasitária das estatinas também foi comprovada por Bienvenu  
14 e Picot (2008) que relataram o efeito neuroprotetor destas drogas quando administradas  
15 em associação com artesunato em casos de malária grave cerebral provenientes da  
16 infecção por *P. falciparum*.

17 Especificamente em relação ao protozoário *T. gondii*, pesquisas recentes  
18 relatam que a sinvastatina, são capazes de inibir a proliferação de taquizoítos em  
19 macrófagos peritoneais (CORTEZ et al., 2009).

20 Como *T. gondii* é incapaz de sintetizar esteróis pela via do mevalonato,  
21 sugere-se que este incorpora e posteriormente metaboliza colesterol do hospedeiro  
22 durante a infecção para síntese de membrana, principalmente do vacúolo parasitóforo,  
23 local exclusivo para replicação do parasito na célula hospedeira. Somando-se a isso,  
24 embora o parasito seja incapaz de sintetizar colesterol, existem evidências para a síntese  
25 de isoprenóides, pela via lipídica do apicoplasto, essenciais ao parasito uma vez que  
26 determinam várias funções importantes como promoção e desenvolvimento do mesmo,  
27 transporte de elétrons mitocondriais e síntese de RNAt. Em ambas, células procarióticas e  
28 eucarióticas, a via dos isoprenóides é amplamente regulada por enzimas envolvidas na  
29 síntese do mevalonato, 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) sintase e  
30 HMGCoA redutase (NISHIKAWA et al., 2011).

31 Sabendo-se que as estatinas bloqueiam a síntese do mevalonato em  
32 humanos e que também atuam no sentido de prevenir a síntese de importantes  
33 isoprenóides intermediários da via biosintética do colesterol, constituem atrativo  
34 alternativo para intervenção terapêutica na toxoplasmose.

1 **2. OBJETIVOS**

2

3 **2.1 Objetivo Geral:**

4

5 Avaliar o efeito dos fármacos pravastatina, sinvastatina isoladamente ou  
6 em associação com sulfadiazina e pirimetamina em células HeLa frente à infecção  
7 experimental pela cepa RH de *Toxoplasma gondii*.

8

9 **2.2 Objetivos específicos:**

10

- 11 ✓ Avaliar a citotoxicidade do tratamento com pravastatina, sinvastatina isoladamente  
12 ou associados com sulfadiazina e pirimetamina nas células HeLa;
- 13 ✓ Determinar os índices de adesão, infecção e replicação intracelular de *T. gondii*  
14 (cepa RH), tratados ou não tratados com pravastatina e sinvastatina isoladamente  
15 ou associadas com sulfadiazina ou pirimetamina;
- 16 ✓ Determinar os índices de adesão, infecção e replicação intracelular de *T. gondii*  
17 cepa RH em células HeLa, quando os parasitos foram previamente tratados com  
18 pravastatina e sinvastatina isoladamente ou em associação com sulfadiazina ou  
19 pirimetamina;
- 20 ✓ Avaliar a produção de citocinas Th1, Th2 e Th17 nas células infectadas ou não  
21 pela (cepa RH) de *T. gondii* e tratadas ou não com pravastatina, sinvastatina.

22

23

24

25

26

27

1 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

2 **\*SEGUNDO NORMAS DA ABNT 2002**

3 ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia:  
4 W.B. Saunders, p. 553, 7<sup>a</sup> edição 2003.

5 ABDALLAH, R. B.; AUON, K.; SIALA, E.; SOUISSI, O.; MAATOUG, R.; HLIOUI, S.;  
6 BOURATBINE, A. La toxoplasmose congénitale en Tunisie: analyse Clinique et biologique  
7 de 11 cas. **Archives des Pédiatrie**, França, v. 16, n. 2, p. 118-122, 2009.

8 AFZALI, B.; LOMBARDI, G.; LECHLER, R. I.; LORD, G, M. The role of T helper 17 (Th17)  
9 and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease.  
10 **Clinical and Experimental Immunology**. v.148, n. 1, p. 32-46, 2007.  
11

12 AJZENBERG, D.; COGNE, N.; PARIS, L. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates  
13 associated with human congenital toxoplasmosis and correlation with clinical findings.  
14 **Journal Infectious Diseases**, v.186, n. 5, p. 684-689, 2002.

15 AMENDOEIRA, M. R. R. Mecanismos de transmissão da toxoplasmose. **Anais da**  
16 **Academia Nacional de Medicina**, Brasil, v. 155, n. 4, p. 224-225, 1995.

17 ATILLA, A.; AYDIN, S.; DEMIRDÖVEN, A. N.; KILIÇ, S. S. Severe toxoplasmic hepatitis in  
18 an immunocompetent patient. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 68, n. 5, p.  
19 407-409, 2015.

20  
21 BARBOSA, M. A.; ANGELIN, L. G.; SAIKAWA, G. I. A.; OLIVEIRA, C. J. C.; DA SILVA, S.  
22 S.; VENDRUSCOLO, J. W.; MARINELLO, P. C.; FUJITA, T. C.; ROCHA, S. P. D.;  
23 WATANABE, M. A. E.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; COSTA, I. N. Potenciais alternativas  
24 terapêuticas em estudo para a toxoplasmose congênita: Uma revisão bibliográfica.  
25 **Revista Patologia Tropical**, v. 44, n. 1, p. 1-11, 2015.

26 BARRAGAN, A.; BROSSIER, F.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma*  
27 *gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM 1) with the  
28 parasite adhesin MIC2. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 561-568, 2005.

29 BIENVENU, A. L.; PICOT, S. Letters to editor: Statins alone are ineffective in cerebral

- 1 malaria but potentiate artesunate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n.  
2 11, p. 4203-4204, 2008.
- 3 BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host:  
4 impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS About**  
5 **author manuscript**, v. 117, n. 5-6, p. 458-476, 2009.
- 6 BOJAR, I.; SZYMAŃSKA, J. Environmental exposure of pregnant women to infection with  
7 *Toxoplasma gondii* – state of the art. **Annals of Agricultural and Environmental**  
8 **Medicine**, v. 17, n. 2, p. 209–214, 2010.
- 9 BOUCHUT, A.; GEIGER, J. A.; DE ROCHER, A. E.; MARILYN PARSONS, M. Vesicles  
10 Bearing *Toxoplasma* Apicoplast Membrane Proteins Persist Following Loss of the Relict  
11 Plastid or Golgi Body Disruption. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112096, 2014.  
12
- 13 BOYER, K. M.; HOLFELS, E.; ROIZEN, N.; SWISGER, C.; MACK, D.; REMINGTON, J.;  
14 WITHERS, S.; MEIER, P.; McLEOD, R. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in  
15 mothers of infants with congenital toxoplasmosis: implications for prenatal management  
16 and screening. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 192, n. 2, p. 564-  
17 571, 2005.
- 18 BRUNET, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. **International immunopharmacology**,  
19 v. 1, n. 8, p.1457–1467, 2001.
- 20 CAMPO, V. L.; CARVALHO, I.; Estatinas hipolipemicas e novas tendências terapêuticas.  
21 **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.
- 22 CAPOBIANGO, J. D.; BREGANÓ, R. M.; NAVARRO, I. T.; REZENDE NETO, C.  
23 P.; CASELLA, A. M.; MORI, F. M.; PAGLIARI, S.; INOUE, I. T.; REICHE, E. M. Congenital  
24 toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil. **he Brazilian journal of**  
25 **infectious diseases**, v. 18, n. 4, p. 364-371, 2014.  
26
- 27 CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections:  
28 a review. **Acta Tropica**, v. 121, n. 2, p. 55-70, 2012.  
29
- 30 CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*.

- 1 **Acta Tropica**, v. 81, n. 2, p. 111-122, 2002.
- 2 CASTRO-FILICE, L. S.; BARBOSA, B. F.; ANGELONI, M. B.; SILVA, N. M.; GOMES, A.  
3 O.; ALVES, C. M.; SILVA, D. A.; MARTINS-FILHO, O. A.; SANTOS, M. C.; MINEO, J.  
4 R.; FERRO, E. A. Azithromycin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in human  
5 villous explants. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, p.132, 2014.  
6
- 7 CENCI-GOGA, B. T.; ROSSITTO, P. V.; SECHI, P.; MCCRINDLE, C. M. E.; CULLOR, J.  
8 S. *Toxoplasma* in Animals, Food, and Humans: An Old Parasite of New Concern.  
9 **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 7, p. 751-762, 2011.
- 10 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Toxoplasmosis (*Toxoplasma*  
11 infection). Available in: <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>, Access  
12 in: March 20, 2015.
- 13 CHEN, G. Z.; FOSTER, L.; BENNETT, J. L. Purification and characterization of 3-  
14 hydroxymethylglutaryl-coenzyme a reductase of *Schistosoma mansoni*: Regulation of  
15 parasite enzyme activity differs from mammalian host. **Experimental Parasitology**, v. 73,  
16 n. 1, p. 82–92, 1990.
- 17 CHRISTIANS, U.; JACOBSEN, W.; FLOREN, L. C. Metabolism and drug interactions of 3-  
18 Hydroxy-3-Methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: are the  
19 statins mechanistically similar? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 80, n. 1, p. 1-34, 1998.
- 20 COMMODARO, A. G.; BELFORT, R. N.; RIZZO, L. V.; MUCCIOLI, C.; SILVEIRA, C.;  
21 BURNIE, J. R. M.N.; BELFORT, JR. R. Ocular toxoplasmosis - an update and review of  
22 the literature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 345–350, 2009.
- 23 COPPENS, I. Targeting lipid biosynthesis and salvage in apicomplexan parasites for  
24 improved chemotherapies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 823–835, 2013.
- 25 COPPENS, I.; BASTIN, P.; LEVADE, T.; COURTOY, P. J. Activity, pharmacological  
26 inhibition and biological regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in  
27 *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 69, n. 1, p. 29-40,  
28 1995.
- 29 COPPENS, L.; DUNN, J. D.; ROMANO, J. D.; PYPAERT, M.; ZHANG, H.; BOOTHROYD,  
30 J. C.; JOINER, K. A. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in  
31 the vacuolar space. **Cell**, v. 125, n. 2, p. 261-274, 2006.

- 1 CORDEIRO, C. A.; MOREIRA, P. R.; DUTRA, W. O.; YOUNG, L.; CAMPOS, W.  
2 R.; ORÉFICE, F.; TEIXEIRA JÚNIOR, A. L. Immunology of the Toxoplasmic  
3 etinochoroiditis. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 73, n. 6, p. 548-551, 2010.  
4
- 5 CORSINI, A.; BELLOSTA, S.; BAETTA, R.; FUMAGALLI, R.; PAOLETTI, R.; BERNINI, F.  
6 New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins.  
7 **Pharmacol Ther**, v. 84, n. 3, p. 413–428, 1999.  
8
- 9 CORTESE, C.; LIBERATOSCIOLI, L. Effects of statins on lipoprotein fractions.  
10 **International Congress Series**, v. 1253, p. 247- 252, 2003.
- 11 CORTEZ, E.; STUMBO, A. C.; OLIVEIRA, M.; BARBOSA, H. S.; CARVALHO, L. Statins  
12 inhibit *Toxoplasma gondii* multiplication in macrophages *in vitro*. **International Journal of**  
13 **Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 2, p. 185 – 186, 2009.
- 14 CORTINA-BORJA, M.; TAN, H. K.; WALLON, M.; PAUL, M.; PRUSA, A.; BUFFOLANO,  
15 W.; MALM, G.; SALT, A.; FREEMAN, K.; PETERSEN, E.; GILBERT, R. E. Prenatal  
16 treatment for serious neurological sequelae of congenital toxoplasmosis: an observational  
17 prospective cohort study. **PLoS Med**, v. 7, n. 10, p. 1-10, 2010.  
18
- 19 COSTA, I. N.; ANGELONI, M. B.; SANTANA, L. A.; BARBOSA, B. F.; SILVA, M. C. P.;  
20 RODRIGUES, A. A.; ROSTKOWSA, C.; MAGALHÃES, P. M.; PENA, J. D.; SILVA, D. A.  
21 O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Azithromycin Inhibits Vertical Transmission of  
22 *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). **Placenta (Eastbourne)**, v.  
23 30, p. 884 - 890, 2009.
- 24 DARDÉ, M. L. *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. **Parasite**, v. 15, n. 3, p.  
25 366-71, 2008.
- 26 DE ROCHER, A. E.; KARNATAKI, A.; VANEY, P.; PARSONS, M. Apicoplast Targeting of  
27 a *Toxoplasma gondii* transmembrane protein requires a cytosolic tyrosine-based motif.  
28 **Traffic**, v. 13, n. 5, p. 694–704, 2012.
- 29 DEGERLI, K.; KILIMCIOGLU, A. A.; KURT, O.; TAMAY, T.; OZBILGIN, A. Efficacy of  
30 azithromycin in a murine toxoplasmic model, employing a *Toxoplasma gondii* strain from  
31 Turkey. **Acta Tropica**, v. 88, n. 1, p. 45-50, 2003.

- 1 DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity  
2 during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 569-  
3 588, 1998.
- 4 DENKERS, E. Y.; YAP, G.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHAREST, H.; BUTCHER, B. A.;  
5 CASPAR, P.; HEINY S, SHER A. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host  
6 resistance to *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 159, n. 4, p. 1903-1908,  
7 1997.
- 8 DEROUIN, F.; JACQZ-AIGRAIN, E.; THULLIEZ, P.; COUVREUR, J.; LEPORT, C.  
9 Cotrimoxazole for prenatal treatment of congenital toxoplasmosis? **Parasitology Today**,  
10 v. 16, n. 6, p. 254-256, 2000.
- 11 DESHPANDE, P. S.; KOTRESHA, D.; NOORDIN, R.; YUNUS, M. H.; SAADATNIA, G.;  
12 GOLKAR, M.; OSMAN, S.; KARIM, I. Z.; GHAFARIFAR F. IgG avidity Western Blot using  
13 *Toxoplasma gondii* rGRA-7 cloned from nucleotides 39-711 for serodiagnosis of acute  
14 toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 2, p.  
15 79-83, 2013.
- 16
- 17 DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O.; MILENKOVIĆ, V.; NIKOLIĆ, A.; BOBIĆ, B.; GRUJIĆ, J.  
18 Efficacy of atovaquone combined with clindamycin against murine infection with a  
19 cystogenic (Me49) strain of *Toxoplasma gondii*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.  
20 50, n. 6, p. 981-987, 2002.
- 21
- 22 DUBEY, J. P. Toxoplasmosis-a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n.  
23 1-2, p. 57-72, 2004.
- 24
- 25 DUBEY, J. P.; APPLEWHAITE, L.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; BANDINI, L. A.;  
26 KWOK, O. C. H.; HILL, R.; SU, C. Molecular and biological characterization of  
27 *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America  
28 identified several unique and common parasite genotypes. **Parasitology**, v. 134, n. 11, p.  
29 1559–1565, 2007.
- 30
- 31 DUBEY, J. P.; DENNIS, P. M.; VERMA, S. K.; CHOUDHARY, S.; FERREIRA, L. R.;  
32 OLIVEIRA, S.; KWOK, O. C. H.; BUTLER, E.; CARSTENSEN, M.; SU, C. Epidemiology of

- 1 toxoplasmosis in white tailed deer (*Odocoileus virginianus*): occurrence, congenital  
2 transmission, correlates of infection, isolation, and genetic characterization of *Toxoplasma*  
3 *gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3-4, p. 270-275, 2014.
- 4
- 5 DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K.; SHEN, S.K.; KWOK, C. H. Infection and immunity with the  
6 RH strain of *Toxoplasma gondii* in rats and mice. **The Journal of Parasitology**, v. 85, n.  
7 4, p. 657-662, 1999.
- 8 DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the  
9 United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257–1278, 2008.
- 10 DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C. JONES, J. L. Toxoplasmosis in  
11 humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology.  
12 **Parasitology**, v. 139, n. 11, p.1375-1424, 2012.
- 13
- 14 DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii*  
15 tachizoites, bradizoites, and sporozoites and biology and development of tissue cyst.  
16 **Clinical Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 267-299, 1998.
- 17 DUBEY, J. P.; SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did  
18 they come from. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 190-195, 2009.
- 19 DUMÈTRE, A.; LE BRAS, C.; BAFFET, M.; MENECEUR, P.; DUBEY, J. P.; DEROUIN, F.;  
20 DUGUET, J. P.; JOYEUX, M.; MOULIN, L. Effects of ozone and ultraviolet radiation  
21 treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v.  
22 153, n. 3-4, p. 209-213, 2008.
- 23 DUNAY, I. R.; HEIMESAAT, M. M.; BUSHRAB, F. N.; MÜLLER, R. H.; STOCKER, H.;  
24 ARASTEH, K.; KUROWSKI, M.; FITZNER, R.; BORNER, K.; LIESENFELD, O.  
25 Atovaquone maintenance therapy prevents reactivation of toxoplasmic encephalitis in a  
26 murine model of reactivated toxoplasmosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,  
27 v. 48, n. 12, p. 4848-4854, 2004.
- 28
- 29 DZIADEK, B.; DZIADEK, J.; DLUGONSKA, H. Identification of *Toxoplasma gondii* proteins  
30 binding human lactoferrin: a new aspect of rhoptry proteins function. **Experimental**  
31 **Parasitology**, v. 115, n. 3, p. 277-282, 2007.

- 1 ELBEZ-RUBINSTEIN, A.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; COHEN, R.; DUMÈTRE, A.;  
2 YERA, H.; GONDON, E.; JANAUD, J.C.; THULLIEZ, P. Congenital toxoplasmosis and  
3 reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of  
4 reinfection, and review. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 2, p. 280 –285,  
5 2009.
- 6 ELSHEIKHA, H. M. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action.  
7 **Public Health**, v. 122, n. 4, p. 335-353, 2008.
- 8 EMELIA, O.; RAHANA, A. R.; MOHAMAD FIRDAUS, A.; CHENG, H. S.; NURSYAIRAH,  
9 M. S.; FATINAH, A. S.; AZMAWATI, M. N.; SITI, N. A.; AISAH, M. Y. IgG avidity assay: a  
10 tool for excluding acute toxoplasmosis in prolonged IgM titer sera from pregnant women.  
11 **Tropical biomedicine**, v. 31, n. 4, p. 633-640, 2014.
- 12
- 13 ENDO, A.; KURODA, M.; TANZAWA, K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-  
14 methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites,  
15 having hypocholesterolemic activity. **FEBS Letters**, v. 72, n. 2, p. 323-326, 1976.
- 16
- 17 FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. Ed- Diagnóstico laboratorial. Avaliação de métodos de  
18 diagnóstico das principais doenças infecciosas, parasitária e auto-ímmunes. Correlação  
19 clínico-laboratorial. **Rio de Janeiro, Guanabara Koogan**, 2001. 302p.
- 20 FERRO, E. A. V.; SILVA, D. A. O.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J. R. Effect of *Toxoplasma*  
21 *gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of  
22 congenital toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 7089-7094, 2002.
- 23 FILISETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'**  
24 **Istituto Superiori di Sanita**, v. 40, n. 1, p. 71-80, 2004.
- 25 FLORIN-CHRISTENSEN, M.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; GARIN, C.; ISOLA, E.;  
26 BRENNEN, R. R.; RASMUSSEN, L. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth and sterol  
27 biosynthesis by lovastatin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,  
28 v. 166, n. 3, p. 1441-1445, 1990.
- 29 FRANCO, P. S.; DA SILVA, N. M.; DE FREITAS BARBOSA, B.; DE OLIVEIRA GOMES,  
30 A.; IETTA, F.; SHWAB, E. K.; SU, C.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. *Calomys callosus*

- 1 chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian  
2 strains is not able to prevent vertical transmission. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 6,  
3 p. 181, 2015.
- 4
- 5 FRENKEL, J. K. Pathogenesis, diagnosis and treatment of human toxoplasmosis. **JAMA**,  
6 v. 140, n. 4, p. 369-377, 1949.
- 7
- 8 FRENKEL, J. K. *Toxoplasma* in and around us. **Bioscience**, v. 23, n. 3, p. 343-352, 1973.
- 9 FURTADO, J. M.; SMITH, J. R.; BELFORT, R.; GATTEY, D.; WINTHROP, K. L.  
10 Toxoplasmosis: A global threat. **Journal of Global Infection Diseases**, v. 3, n. 3, p. 281-  
11 284, 2011.
- 12
- 13 GARCÍA-SABINA, A.; GULÍN-DÁVILA, J.; SEMPERE-SERRANO, P.; GONZÁLEZ-  
14 JUANATEY, C.; MARTÍNEZ-PACHECO, R. Consideraciones específicas en la  
15 prescripción e intercambio terapéutico de estatinas. **Farmacia Hospitalaria**, v. 36, n. 2, p.  
16 97-108, 2012.
- 17 GAZZERRO, P.; PROTO, M. C.; GANGEMI, G.; MALFITANO, A. M.; CIAGLIA, E.;  
18 PISANTI, S.; SANTORO, A.; LAEZZA, C.; BIFULCO, M. Pharmacological Actions of  
19 Statins: A Critical Appraisal in the Management of Cancer. **The American Society for**  
20 **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 64, n. 1, p.102–146, 2012.
- 21 GOBEL, A.; MCARDELL, C. S.; JOSS, A.; SIEGRIST, H.; GIGER, W. Fate of  
22 sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment  
23 technologies. **Science of The Total Environment**, v. 372, n. 2-3, p. 361–371, 2007.
- 24
- 25 GOLAN, D. E. **Princípios de Farmacologia: a Base Fisiopatológica da**  
26 **Farmacoterapia**. 2. edição, Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2009.
- 27 GOODSON, M. B.; DON WINSLOW. *Toxoplasma Gondii*: Prevalence in Humans &  
28 Animals. **Genetic Structure & Role in Disease Distribution**, 2013.
- 29 GOOLDMAN, L. S.; GILMAN, A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10º ed. Rio de  
30 Janeiro: **McGraw-Hill**, 2001.

- 1 GRUJIĆ, J.; DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O.; NIKOLIĆ, A.; KLUN, I.; BOBIĆ, B. Effectiveness  
2 of spiramycin in murine models of acute and chronic toxoplasmosis. **International Journal**  
3 **of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 3, p. 226-230, 2005.
- 4 GUITON, R.; VASSEUR, V.; CHARRON, S.; ARIAS, M, T.; VAN, LANGENDONCK,  
5 N.; BUZONI-GATEL, D.; RYFFEL, B.; DIMIER-POISSON, I. Interleukin 17 receptor  
6 signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. The  
7 Journal of Infectious Diseases. v. 202, n. 3, p. 427-35, 2010.  
8
- 9 HAMELIN, B. A.; TURGEON, J. Hydrophilicity lipophilicity: relevance for the pharmacology  
10 and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. **Trends in Pharmacological**  
11 **Sciences**, v. 19, n. 1, p. 26–37, 1998.  
12
- 13 HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical and**  
14 **Experimental Medicine**, v. 3, n. 2, p. 84-105, 2003.
- 15 HORBACH, S.; SAHM, H.; WELLE, R. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: two different  
16 pathways? **FEMS Microbiology Letters**, v. 111, n. 2-3, p.135 -140, 1993.
- 17 HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma*  
18 *gondii* virulence effectors. **Nature reviews Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 766-778, 2012.
- 19 IVERS, L. C.; RYAN, E. T. Farmacologia das Infecções Parasitárias. In: Golan DE,  
20 Tashjian AH, Armstrong EJ, Armstrong AW. **Princípios de farmacologia: a base**  
21 **fisiopatológica da farmacologia**. 3ª edição, p.636-642, Rio de Janeiro: Guanabara  
22 Koogan, 2014.
- 23 JACOBSON, T. A. Comparative pharmacokinetic interaction profiles of pravastatin,  
24 simvastatin, and atorvastatin when coadministered with cytochrome P450 inhibitors.  
25 **American Journal of Cardiology**, v. 94, n. 9, p.1140–1146, 2004.
- 26 KAPOOR, M.; APPLETON, I. Wound healing: abnormalities and future therapeutic targets.  
27 **Current Anaesthesia and Critical Care**, v.16, n. 2, p. 89-93, 2005.
- 28 KASPER, L. H.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii*: immunology and molecular  
29 biology. In: WARREN, K. S. **Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infection**,  
30 3ªEd. Cambridge, 1993.

- 1 KATZUNG, B. C. **Farmacologia Básica & Clínica**. 9ª edição, p. 546 - 554, Rio de  
2 Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- 3 KAWAZOE, U.; MINEO, J. R. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP. **Parasitologia humana**,  
4 12ª edição, p. 163-172, São Paulo: Atheneu, 2011.
- 5 KELLY, M. N.; KOLLS, J. K.; HAPPEL, K.; SCHWARTZMAN, J. D.;  
6 SCHWARZENBERGER, P.; COMBE, C.; MORETTO, M.; KHAN, I. A. Interleukin-  
7 17/interleukin-17 receptor- mediated signaling is important for generation of an optimal  
8 polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infection Immunity*. v.  
9 73, p.617-21, 2005.
- 10 KHAN, A.; DUBEY, J. P.; SU, C.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M.; SIBLEY, L. D.  
11 Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in  
12 North America. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 6, p. 645-655, 2011.
- 13 KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International**  
14 **Journal for Parasitology, England**, v. 34, n.3, p. 423-432, 2004.
- 15 KOCIJAN, A.; GRAHEK, R.; BASTARDA, A.; ZUPANCIC-KRALJ, L. Fast analysis of  
16 pravastatin in production media. **Journal of Chromatography. B, Analytical**  
17 **Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 822, n. 1-2, p. 311-315, 2005.
- 18 KODJIKIAN, L. *Toxoplasma* and pregnancy. **Journal Français D'Ophtamologie**, v. 33, n.  
19 5, p. 362-367, 2010.
- 20 KÜCKELHAUS, C. S; KÜCKELHAUS, S. A. S.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I. Influence of  
21 long-term treatment with pravastatin on the survival, evolution of cutaneous lesion and  
22 weight of animals infected by *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**,  
23 v.127, n. 3, p. 658–664, 2013.
- 24 LAVINE, M. D.; ARRIZABALAGA, G. Invasion and egress by the obligate intracellular  
25 parasite *Toxoplasma gondii*: potential targets for the development of new antiparasitic  
26 drugs. **Current Pharmaceutical Desingn, Netherlands**, v. 13, n. 6, p. 641-651, 2007.
- 27 LEÃO, P. R.; MEIRELES FILHO, J.; MEDEIROS, S. F. Toxoplasmosis: seroprevalence in  
28 postpartum women attended by SUS (Brazilian Public Health System). **Revista Brasileira**  
29 **de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 8, p. 627-632, 2004.

- 1 LI, Z. H.; RAMAKRISHNAN, S.; STRIEPEN, B.; MORENO, S. N. *Toxoplasma gondii* relies  
2 on both host and parasite isoprenoids and can be rendered sensitive to atorvastatin. **PLoS**  
3 **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 1003665, 2013.
- 4  
5 LIM, L.; LINKA, M.; MULLIN, K. A.; WEBER, A. P.; McFADDEN, G. I. The carbon and  
6 energy sources of the non-photosynthetic plastid in the malaria parasite. **FEBS Letters**, v.  
7 584, n. 3, p. 549–554, 2010.
- 8 LINDBERG, R. E.; FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis in nude mice. **Journal of**  
9 **Parasitology**, v. 63, n. 2, p. 219-221, 1977.
- 10 LIU, Q.; WEI, F.; GAO, S.; JIANG, L.; LIAN, H.; YUAN, B.; YUAN, Z.; XIA, Z.; LIU, B.; XU,  
11 X.; ZHU, X. Q. *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. **Transactions of**  
12 **the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 2, p. 162-166, 2009.
- 13 LOPES-MORI, F. M. R.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; GONÇALVES, D. D.; FREIRE, R. L.;  
14 KARIGYO, C. J. T.; WEDY, G. F.; MATSUO, T.; REICHE, E. M. V.; MORIMOTO, H. K.;  
15 CAPOBIANGO, J. D.; INOUE, I. T.; GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T. Factors associated  
16 with the seropositivity for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women of  
17 Londrina, Paraná, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 378-382,  
18 2009.
- 19 MARTINS-DUARTE, E. S.; URBINA, J. A.; SOUZA, W.; VOMMARO, R. C.  
20 Antiproliferative activities of two novel quinuclidine inhibitors against *Toxoplasma gondii*  
21 tachyzoites *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 59–65,  
22 2006.
- 23 MASON, R. P. Molecular Basis of Differences Among Statins and a Comparison  
24 with Antioxidant Vitamins. **American Journal of Cardiology**, v. 98, n. 11, p. 34-41, 2006.
- 25 McFADDEN, G. I. The apicoplast. Review. **Protoplasma**, v. 248, p. 641–650, 2011.
- 26 MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the  
27 innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology, England**,  
28 v.39, n. 1, p. 23-39, 2009.
- 29 MONCADA, S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology.  
30 **Pharmacology Reviews**, v. 43, n. 2, 109-42, 1991.

- 1 MONICK, M. M.; POWERS, L. S.; BUTLER, N. S.; HUNNINGHAKE, G. W. Inhibition of  
2 Rho family GTPases results in increased TNF $\alpha$  production after lipopolysaccharide  
3 exposure. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 5, p. 2625-2630, 2003.
- 4 MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, n. 9425, p.  
5 1965-1976, 2004.
- 6 MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*.  
7 **Immunological Reviews**, v. 240, n. 1, p. 269-85, 2011.
- 8 NISHIKAWA, Y.; IBRAHIM, H. M.; KAMEYAMA, K.; SHIGA, I.; HIASA, J.; XUAN, X. Host  
9 cholesterol synthesis contributes to growth of intracellular *Toxoplasma gondii* in  
10 macrophages. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 5, p. 633-639. 2011.
- 11 OZ, H. S.; TOBIN, T. Atovaquone ameliorate gastrointestinal toxoplasmosis complications  
12 in a pregnancy model. **Medical Science Monitor**, v. 18, n. 9, p. 337-345, 2012.
- 13 PENA, H. F. J.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; SU, C. Population structure and mouse-  
14 virulence of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 5, p.  
15 561-569, 2008.
- 16 PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 12, n. 3, p.  
17 214-223, 2007.
- 18 PEYRON, F.; ATEBA, A. B.; WALLON, M.; KODJIKIAN, L.; BINQUET, C.; FLEURY, J.;  
19 GRAWEG, J. Congenital toxoplasmosis in twins: a report of fourteen consecutive cases  
20 and a comparison with published data. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 22,  
21 n. 8, p. 695-701, 2003.
- 22 PFEFFERKORN, E. R. Cell biology of *Toxoplasma gondii*, In: Wyler, D. J. **Modern**  
23 **Parasite Biology: Cellular, Immunological and Molecular Aspects**, New York: W. H.  
24 Freeman, 1990.
- 25 PIET BORST.; VAN DER PLOEG, L. H.; CORNELISSEN, A. W.; BARRY, J. D.  
26 Chromosomes of kinetoplastida. **The EMBO Journal**, v. 3, n. 13, p. 3109–3115, 1984.
- 27 PIFER, R.; YAROVINSKY, F. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and  
28 humans. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 388-393, 2011.

- 1 POLLARD, A. M.; ONATOLU, K. N.; HILLER, L.; HALDAR, K.; KNOLL, L. J. Highly  
2 polymorphic family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens with  
3 evidence of developmental regulation in *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v.  
4 76, n. 1, p. 103-110, 2008.
- 5 QIDWAI, T.; KHAN, F. Antimalarial Drugs and Drug Targets Specific to Fatty Acid  
6 Metabolic Pathway of *Plasmodium falciparum*. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 80,  
7 n. 2, p. 155-72, 2012.
- 8 REMINGTON, J. S.; McLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. In: **Infectious**  
9 **Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. 5° edição. Toxoplasmosis, p. 205-345,  
10 2001.
- 11 REMINGTON, J.S.; KLEIN, J. O.; NIZET, V. MALDONADO, Y. A. Editors. Infectious  
12 diseases of the fetus and newborn infant, 7th ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders; p.  
13 918-1041, 2011.
- 14 ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for  
15 Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–296, 2012.
- 16 SAADATNIA, G.; GOLKAR, M. A review on human toxoplasmosis. **Scandinavian Journal**  
17 **of Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p. 805-14, 2012.
- 18
- 19 SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of the American Medical**  
20 **Association**, v. 116, n. 9, p. 801-807, 1941.
- 21 SALOMÃO, C. L. Isolamento e caracterização genotípica de cepas de *Toxoplasma gondii*  
22 de galinha caipiras (*Gallus gallus domesticus*) da cidade de Uberlândia, MG. 2007. 30f.  
23 Monografia (no formato de artigo científico) – **Instituto de ciências Biológicas**,  
24 Universidade federal de Uberlândia, Campus Umuarama, 2007.
- 25 SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamics properties of  
26 statins: an update. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 117–125,  
27 2005.
- 28 SCHLÜTER, D.; LOHLER, J.; DECKERT, M.; HOF, H.; SCHWENDEMANN, G.  
29 *Toxoplasma* encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical

- 1 characterisation of *Toxoplasma* antigen, infiltrates and major histocompatibility complex  
2 gene products. **Journal of Neuroimmunology**, v. 31, n. 3, p. 185-198, 1991.
- 3 SEEBER, F.; SOLDATI-FAVRE, D. Metabolic Pathways in the Apicoplast of Apicomplexa.  
4 International. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 281, p.161-228,  
5 2010.
- 6 SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of  
7 serological diagnosis. **Clinical microbiology and infection**, v. 12, n. 6, p. 504-512, 2006.
- 8 SHARMA, H. M.; HANNA, A. N.; KAUFFMAN, E. M.; NEWMAN, H. A. Inhibition of human  
9 low-density lipoprotein oxidation in vitro by Maharishi Ayur-Veda herbal mixtures.  
10 **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 43, n. 4, p.1175-1182, 1992.
- 11 SHITARA, Y.; SUGIYAMA, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-  
12 hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug–drug  
13 interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions.  
14 **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 71-105, 2006.
- 15 SIBLEY, L. D.; KHAN, A.; AJIOKA, J. W.; ROSENTHAL, B. M. Genetic diversity of  
16 *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Philosophical transactions of the Royal  
17 Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 364, n. 1530, p. 2749-2761, 2009.
- 18 SIBLEY, L.D.; AJIOKA, J.W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion  
19 driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Annual review of  
20 Microbiology**, v. 62, p. 329-351, 2008.
- 21 SILVA, P. Sulfonamidas e outros quimioterápicos. In: **Farmacologia**. 5° ed. Guanabara  
22 Koogan, Cap. 114, p.1021-1035, 1998.
- 23 SILVA, R. C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior  
24 manipulation. **Parasitology Research**, v. 105, n. 4, p. 893- 898, 2009.
- 25 SILVEIRA, C.; MUCCIOLI, C.; HOLLAND, G. N.; JONES, J. L.; YU, F.; DE PAULO,  
26 A.; BELFORT, R. JR. Ocular Involvement Following an Epidemic of *Toxoplasma gondii*  
27 Infection in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. **American journal of Ophthalmology**, v. 159, n.  
28 6, p. 1013-1021, 2015.

- 1 SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of  
2 tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitology Research**, v. 107, n. 2, p, 253- 260,  
3 2010.
- 4 SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita dei conigli. Incontrato nelle lesioni  
5 anatomiche d una malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. **Revista**  
6 **Academia Ciência**, v. 3, n. 109, p. 109-112, 1908.
- 7 STRAUB, K.; CHENG, S.; SOHN, C.; BRADLEY, P. Novel components of the  
8 Apicomplexan moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements.  
9 **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 590-603, 2009.
- 10 STUTZ, A.; KESSLER, H.; KASCHEL, M. E.; MEISSNER, M.; DALPKE, A. H. Cell  
11 invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by  
12 *Toxoplasma gondii*. **Immunobiology**, v. 217, n. 1, p. 28-36. 2012.
- 13 SUBAUSTE, C. S.; KONIARIS, A. H.; REMINGTON, J. S. Murine CD8+ cytotoxic T  
14 lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii* infected cells. **Journal of Immunology**, v. 147, n.  
15 11, p. 3955-3959, 1991.
- 16 SUZUKI, Y.; ORELLANA, M. A.; SCHREIBER, R. D.; REMINGTON, J. S. Interferon  $\gamma$ : the  
17 major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 240, n. 4851, p. 516-  
18 518, 1988.
- 19 TAKAHASHI, E. E.; ROSSI, C. L. IgM and IgA antibody responses in 12 cases of human  
20 acquired toxoplasmosis. **Revista Instituto Medicina Tropical Sao Paulo**, v. 39, n. 6, p.  
21 327-31, 1997.
- 22 TANIMURA, K.; NISHIKAWA, A.; TAIRAKU, S.; SHINOZAKI, N.; DEGUCHI,  
23 M.; MORIZANE, M.; EBINA, Y.; MORIOKA, I.; YAMADA, H. The IgG avidity value for the  
24 prediction of *Toxoplasma gondii* infection in the amniotic fluid. **Journal of Infection and**  
25 **Chemotherapy**, v. 21, n. 9, p. 668-671, 2015.
- 26 VALDÈS, V.; LEGAGNEUR, H.; WATRIN, V.; PARIS, L.; HASCOET, J. M. Congenital  
27 toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. **Archives de Pédiatrie**, v.  
28 18, n. 7, p. 761-3, 2011.
- 29 VALLOCHI, A. L.; MUCCIOLI, C.; MARTINS, M. C.; SILVEIRA, C.; BELFORT, R. Jr.;

- 1 RIZZO, L. V. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in  
2 humans in Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, n. 2, p. 350-351, 2005.
- 3 WANG, X. H.; KIKUCHI, T.; SUZUKI, Y. Gamma interferon production, but not perforin-  
4 mediated cytolytic activity, of T cells is required for prevention of toxoplasmic encephalitis  
5 in BALB/c mice genetically resistant to the disease. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 8,  
6 p. 4432–4438, 2004.
- 7 WERMUTH, C. G. Primary Exploration of Structure Activity Relationships. In: **The**  
8 **Practice of Medicinal chemistry**. Academic Press: San Diego, p. 243-295, 1996.
- 9 WILLIAMSON, D. H.; WILSON, R. J. M.; BATES, R. A.; McCREADY, S.; PERLER, R.;  
10 QIANG, B-U. Nuclear and mitochondrial DNA of the primate parasite *Plasmodium*  
11 *knowlesi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 14, n. 2, p. 199-209, 1985.
- 12 WITTE M. B.; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. **American Journal of**  
13 **Surgery**, v. 183, n. 4, p. 406-412, 2002.
- 14 ZHOU, X. W.; KAFSACK, B. F. C.; COLE, R. N.; BECKETT, P.; SHEN, R. F.;  
15 CARRUTHERS, V. B. The opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* deploys a diverse  
16 legion of invasion and survival proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 40,  
17 p. 34233- 34244, 2005.
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27

1 **3.1 PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

2 **ARTICLE – 1**

3



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/actatropica](http://www.elsevier.com/locate/actatropica)

## Pravastatin and simvastatin inhibit the adhesion, replication and proliferation of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in HeLa cells



Raquel Arruda Sanfelice<sup>a</sup>, Suelen Santos da Silva<sup>a</sup>, Larissa Rodrigues Bosqui<sup>a</sup>, Milena Menegazzo Miranda-Sapla<sup>a</sup>, Bellisa Freitas Barbosa<sup>b</sup>, Rafaela José Silva<sup>b</sup>, Eloísa A. Vieira Ferro<sup>b</sup>, Luciano Aparecido Panagio<sup>c</sup>, Itamar Teodorico Navarro<sup>d</sup>, Juliano Bordignon<sup>e</sup>, Ivete Conchon-Costa<sup>a</sup>, Wander Rogerio Pavanelli<sup>a</sup>, Ricardo Sergio Almeida<sup>c</sup>, Idessania Nazareth Costa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Patologia Experimental – Laboratório de Protozoologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Microbiologia – Laboratório de Micologia Médica e Microbiologia Bucal, Universidade Estadual de Londrina, PR, Londrina, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

<sup>e</sup> Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas, ICC/Fiocruz, Curitiba, PR, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 July 2016

Received in revised form

21 November 2016

Accepted 8 December 2016

Available online 21 December 2016

#### Keywords:

*Toxoplasma gondii*

HeLa cell

Statins

### ABSTRACT

The conventional treatment for toxoplasmosis with pyrimethamine and sulfadiazine shows toxic effects to the host, and it is therefore necessary to search for new drugs. Some studies suggest the use of statins, which inhibit cholesterol synthesis in humans and also the initial processes of isoprenoid biosynthesis in the parasite. Thus, the objective of this study was to evaluate the activity of the statins pravastatin and simvastatin in HeLa cells infected *in vitro* with the RH strain of *T. gondii*. HeLa cells ( $1 \times 10^5$ ) were infected with *T. gondii* tachyzoites ( $5 \times 10^5$ ) following two different treatment protocols. In the first protocol, *T. gondii* tachyzoites were pretreated with pravastatin (50 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and simvastatin (1.56 and 3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 30 min prior to infection. In the second, HeLa cells were first infected ( $5 \times 10^5$ ) with tachyzoites and subsequently treated with pravastatin and simvastatin for 24 h at the concentrations noted above. Initially, we evaluated the cytotoxicity of drugs by the MTT assay, number of tachyzoites adhered to cells, number of infected cells, and viability of tachyzoites by trypan blue exclusion. The supernatant of the cell cultures was collected post-treatment for determination of the pattern of Th1/Th2/Th17 cytokines by cytometric bead array. There was no cytotoxicity to HeLa cells with 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pravastatin and 1.56 and 3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  simvastatin. There was no change in the viability of tachyzoites that received pretreatment. Regarding the pre- and post-treatment of the cells with pravastatin and simvastatin alone, there was a reduction in adhesion, invasion and proliferation of cells to *T. gondii*. As for the production of cytokines, we found that IL-6 and IL-17 were significantly reduced in cells infected with *T. gondii* and treated with pravastatin and simvastatin, when compared to control. Based on these results, we can infer that pravastatin and simvastatin alone possess antiproliferative effects on tachyzoites forms of *T. gondii*, giving these drugs new therapeutic uses.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author at: Departamento de Ciências Patológicas, CCB, Laboratório de Parasitologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil/Rodovia Celso Garcia Cid Campus Universitário, Cx. Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brazil.  
E-mail address: [idessania@hotmail.com](mailto:idessania@hotmail.com) (I.N. Costa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.12.006>  
0001-706X/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Toxoplasmosis is an infection caused by the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* and constitutes a serious public health problem. It has a high prevalence and wide distribution, affecting 50–80% of the world population (Dubey et al., 2012; Dubey et al., 2014). The infection is usually asymptomatic but can cause serious damage in immunocompromised individuals (Kawazoe and Mineo, 2011) or during congenital infection (McAuley, 2014; Capobianco, 2014).

and may lead to severe symptomatic cases such as retinochoroiditis (Silveira et al., 2015) or lesions in the central nervous system (Inaba et al., 2014).

The severity of the clinical manifestations of toxoplasmosis depends on several factors, such as type of strain of *T. gondii*, gestational period, geographical location and immunological resistance of the host (Montoya and Remington, 2008).

The immune response induced by *T. gondii* infection is started by the activation of immune cells such as macrophages and the production of proinflammatory cytokines (Denkers and Gazzinelli, 1998; Gazzinelli and Denkers, 2006), including the following: interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), interleukin (IL)-6, IL-17 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Garweg and Candolfi, 2009; Lahmar et al., 2009). The evasion of the immune system occurs with the aid of organelles such as rhoptries, micronemes and dense granules, which are also responsible for parasite adhesion and invasion (Blader and Saeij, 2009).

*T. gondii* also features a structure called an apicoplast, which is homologous to a plant chloroplast and has important functions in the parasite's metabolism, where it is essential to its survival (McFadden, 2011).

The main functions of the *T. gondii* apicoplast are to provide metabolites for the synthesis of fatty acids (Ramakrishnan et al., 2012, 2013) and isoprenoids (Qidwai and Khan, 2012; Coppens, 2014). Isoprenoids are an essential energy source for the replication of the parasite in the host cell and are synthesized by the protozoan via 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DOXP) pathway (Seeber and Soldati-Favre, 2010; Li et al., 2013). Although *T. gondii* is unable to synthesize sterols via the mevalonate pathway, present in animals and fungi, this protozoan can incorporate isoprenoids from the host's cholesterol metabolism, using them for the synthesis of membranes, especially the parasitophorous vacuole (Nishikawa et al., 2011; Li et al., 2013).

Because of these factors and also differences in metabolic pathways characteristic of humans, the apicoplast has been a major target of action for drugs, such as statins (Nishikawa et al., 2011; Coppens, 2013; Li et al., 2013).

Treatment of toxoplasmosis is currently with the combination of sulfadiazine and pyrimethamine, which act synergistically to block the folate synthesis pathway by inhibiting the enzymes dihydropteroate synthase (DHPS) and dihydrofolate reductase (DHFR), which are essential for the survival and replication of the parasite (Anderson, 2005). However, these drugs have many side effects and toxic effects in humans and may cause megaloblastic anemia, leukopenia and granulocytopenia (Gobel et al., 2007). Thus, there is an urgency to investigate new drugs to minimize harmful effects to the host and to be more effective against the parasite (Costa et al., 2009; Barbosa et al., 2015).

It is known that statins decrease plasma cholesterol levels and are used in lipid-lowering therapy (Pahan, 2006). The inhibition of cholesterol synthesis by these drugs occurs via mevalonate impeding the initial processes of isoprenoid biosynthesis (Nishikawa et al., 2011; Li et al., 2013).

Some authors have reported the direct and/or indirect effect of statins on various parasites, for example, the direct effect of pravastatin on lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis* (Kückelhaus et al., 2013), the possible morphological alterations promoted by lovastatin in *Trypanosoma cruzi* (Kessler et al., 2013), direct effects of pravastatin, fluvastatin, atorvastatin and simvastatin in mice with cerebral malaria caused by *Plasmodium falciparum* (Bienvenu and Picot 2008), and direct activity of simvastatin in murine macrophages infected with *T. gondii* (Cortez et al., 2009).

However, there are no reports in the literature on the role of pravastatin in *in vitro* infection with *T. gondii*, and also, there are

few studies that have determined the activity of simvastatin (Cortez et al., 2009) in human cell models of infection with this protozoan.

Thus, the objective of this study was to evaluate the direct and indirect effect of pravastatin and simvastatin on tachyzoite forms of *T. gondii* (RH strain), and during infection of HeLa cells.

## 2. Methods

### 2.1. Culture of HeLa cells

HeLa cells, originating from a human uterine cervix tumor, were acquired from the American Type Culture Collection (ATCC, CCL2<sup>TM</sup>; Manassas, VA, USA) and maintained in culture in the Medical Mycology and Oral Microbiology Laboratory, State University of Londrina.

The cells were grown in 75-cm<sup>2</sup> culture flasks (Ciencor Scientific, Brazil) with RPMI 1640 medium (Sigma Chemical CO., Brazil) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich), 1% antibiotics (10,000 U/mL penicillin and 10 mg/mL streptomycin solution) (Cultilab, Brazil), L-glutamine, sodium pyruvate and 2-mercaptoethanol (complete medium for HeLa – MCH). Cell cultures were maintained in an incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C and used for *in vitro* experimental infection assays as well as maintaining the RH strain of *T. gondii*.

### 2.2. Maintenance of RH strain of *T. gondii*

Tachyzoites of RH strain of *T. gondii* were kindly provided by Prof. Itamar Teodorico Navarro – State University of Londrina. Parasites were kept in cultured HeLa cells in MCH (2% FBS), in an incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C, where they were successively passaged in *in vitro* culture (Barbosa et al., 2012).

### 2.3. Treatments

Pravastatin obtained from the Laboratório Catarinense SA (Joinville, Brazil) was dissolved in distilled water at a concentration of 12.8 mg/mL (stock solution). Simvastatin, obtained from the same company, was dissolved in 0.25 M NaOH at a concentration of 5 mg/mL (stock solution) with warming at 37 °C for 1 h, and the pH of the solution was adjusted to 7.4 to cleave the pre-drug and obtain the active drug (Nyilasi et al., 2010).

A combination of pyrimethamine and sulfadiazine was used as the positive control. Pyrimethamine (Sigma Chemical CO., Brazil) and sulfadiazine (Sigma Chemical CO., Brazil) were dissolved in complete culture medium RPMI with 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Invitrogen-Gibco) at a concentration of 100  $\mu$ g/mL. Different drug concentrations were prepared by diluting the stock solution and used for treatment of tachyzoites and infected HeLa cells).

### 2.4. HeLa cell viability by MTT assay

The viability of HeLa cells after treatment with simvastatin and pravastatin was evaluated on basis of mitochondrial oxidation, by means of the colorimetric MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Chemical Co., Brazil) (Mosmann, 1983). HeLa cells were grown in 96-well plates (3  $\times$  10<sup>4</sup> cells/well/200  $\mu$ L) for 24 h in MCH at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After this period, the cells were treated for 24 h with the sulfadiazine and pyrimethamine combination (1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ g/mL) to establish the concentrations of 25 and 50  $\mu$ g/mL used as positive control; pravastatin (1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ g/mL) and simvastatin (1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ g/mL). Cells that received only MCH were used as the negative control. After treatment, the medium was removed, and the cells

were incubated with MTT solution (5 mg/mL) for 3 h under the same growth conditions. The formazan crystals were solubilized in 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 50% dimethyl formamide (DMF), and after 30 min incubation, absorbance was read at 570 nm with a plate reader (TP Reader, Thermo Plate). The results were expressed as percentage of MTT reduction relative to the control group, calculated with the following formula: viable cells (%) = (Abs of treated cells/Abs of untreated cells) × 100.

### 2.5. Viability of *T. gondii* tachyzoites by trypan blue exclusion

Trypan blue exclusion was used in the infection model at pre-treatment to determine the viability of *T. gondii* tachyzoites treated with pravastatin and simvastatin for 30 min. *T. gondii* tachyzoites ( $5 \times 10^5$ ) were pretreated for 30 min with the pyrimethamine and sulfadiazine combination (50 and 25 µg/mL, respectively), pravastatin (50 and 100 µg/mL) or simvastatin (1.56 and 3.125 µg/mL). After the treatments, the parasites were stained with trypan blue and cells were counted in a Neubauer chamber with a light microscope (E100, Nikon – LED). The parasites that were unstained were considered viable and blue ones were considered nonviable (Strober, 2015). The percentage of viable cells was calculated using the following formula: viable cells (%) = (total viable cells/total cells (viable + dead)) × 100.

### 2.6. Experimental infection in pre- and post-treatment models

To evaluate the effect of pravastatin and simvastatin on adhesion, invasion and proliferation of *T. gondii* in HeLa cells, we used experimental models of infection with pre- and post-treatment.

In the pre-treatment model, *T. gondii* tachyzoites ( $5 \times 10^5$ ) were pre-treated with the pyrimethamine and sulfadiazine combination (50 and 25 µg/mL, respectively) (positive control) and pravastatin (50 and 100 µg/mL) or simvastatin (1.56 and 3.125 µg/mL) for 30 min. Tachyzoites that were treated with MCH were considered the negative control. After treatment, tachyzoites were washed and transferred to 24-well culture plates containing HeLa cells ( $1 \times 10^5$ ) adhered to 13-mm round coverslips (Ciencor Scientific, Brazil) where they remained for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. For the post-treatment model, HeLa cells ( $1 \times 10^5$ ) maintained in 24-well plates containing 13-mm round coverslips were infected with  $5 \times 10^5$  tachyzoites of the RH strain of *T. gondii*. After 3 h of infection, the cells were washed and treated with pyrimethamine and sulfadiazine combined (50 and 25 µg/mL, respectively), pravastatin (50 and 100 µg/mL) or simvastatin (1.56 and 3.125 µg/mL) for 24 h.

After 24 h, in the two types of treatment, cells were fixed with 10% paraformaldehyde in PBS for 24 h and washed with PBS to remove unbound material. Cells were stained with 1% toluidine blue (Sigma Chemical Co.) for 5 min and mounted onto glass slides for examination by light microscopy (E100, Nikon – LED). The cells were analyzed by light microscopy with oil immersion to determine *T. gondii* infection rate (number of cells infected per 200 cells examined), number of *T. gondii* tachyzoites adhered per cell, and intracellular proliferation of the parasite (total number of intracellular parasites per 200 cells examined) (Barbosa et al., 2012). The supernatant after infection was collected and stored at –80 °C for further cytokine assay.

### 2.7. Determination of cytokine levels

The cytokines present in the medium of infected cells in the pre- and post-treatment models were analyzed by cytometric bead array (CBA). The levels of cytokines were determined according to the kit instructions (BD CBA Human Th1/Th2/Th17) using the Becton Dickinson FACSCanto II apparatus. The cytometry data were

analyzed using FCAP Array, v1.0.1 (Soft Flow, Pecs, Hungary), and the concentrations of cytokines were obtained in pg/mL.

### 2.8. Statistical analysis

All data represent the mean and standard deviation of three independent experiments performed in triplicate. Differences between treatments and controls were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test, using GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Statistical significance was considered when  $P \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Treatment with pravastatin and simvastatin does not alter HeLa cell viability

The MTT assay was used to determine the cytotoxicity of pravastatin and simvastatin to HeLa cells and to determine the concentrations that would be used in infection experiments. Treatment of HeLa cells with different concentrations of pravastatin for 24 h was not toxic when compared to the negative control (Fig. 1A). However, treatment with simvastatin at concentrations of 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL for 24 h significantly reduced the viability of HeLa cells, while the lower concentrations of 1.56 and 3.12 µg/mL did not affect cell viability compared to the control (Fig. 1B). Cells treated with conventional drugs, namely pyrimethamine and sulfadiazine, combined at respective concentrations of 50 and 25 µg/mL for 24 h, showed no decrease in cell viability (Fig. 1C).

Thus, 50 and 100 µg/mL pravastatin and 1.56 and 3.125 µg/mL simvastatin, and 50 µg/mL pyrimethamine and 25 µg/mL sulfadiazine were selected to carry out the *in vitro* experiments.

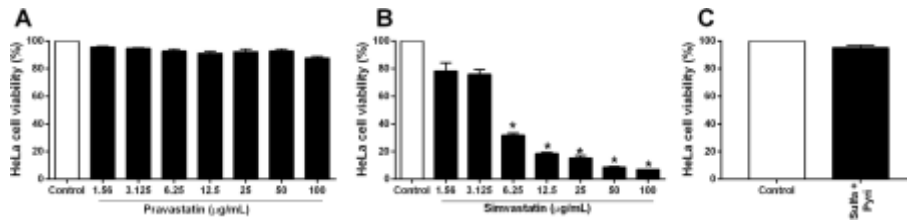
### 3.2. Pre-treatment of *T. gondii* tachyzoites with pravastatin and simvastatin does not alter parasite viability

In an attempt to assess the direct effect of statins on *T. gondii* and knowing it to be an obligate intracellular protozoan that is viable for a short time outside the cell, we evaluated the efficacy of pravastatin (50 and 100 µg/mL) and simvastatin (1.56 and 3.125 µg/mL) for 30 min. We observed that these drugs were not able to reduce the viability of the parasite at these concentrations and in this time (Fig. 2A and B).

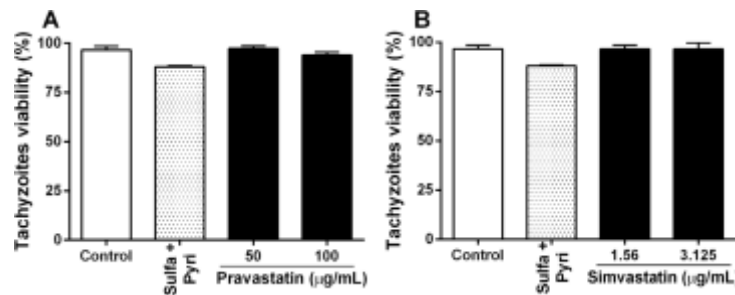
### 3.3. Pre-treatment of *T. gondii* tachyzoites with pravastatin and simvastatin reduces adhesion, infection and proliferation in HeLa cells

To demonstrate if the pre-treatment of *T. gondii* tachyzoites with statins for 30 min directly influenced the processes of adhesion, invasion and proliferation of the protozoan, we used the HeLa cell infection model. Initially, we observed that pre-treatment with 50 and 100 µg/mL pravastatin reduced the number of tachyzoites adhering to cells by 22 and 27%, respectively ( $P \leq 0.01$ ) (Fig. 3A). With simvastatin, there was a 3% decrease in cell adhesion at 1.56 µg/mL and 30% at 3.125 µg/mL ( $P \leq 0.05$ ;  $P \leq 0.001$ ) (Fig. 3D). The conventional treatment caused a 47% reduction (Fig. 3A and D).

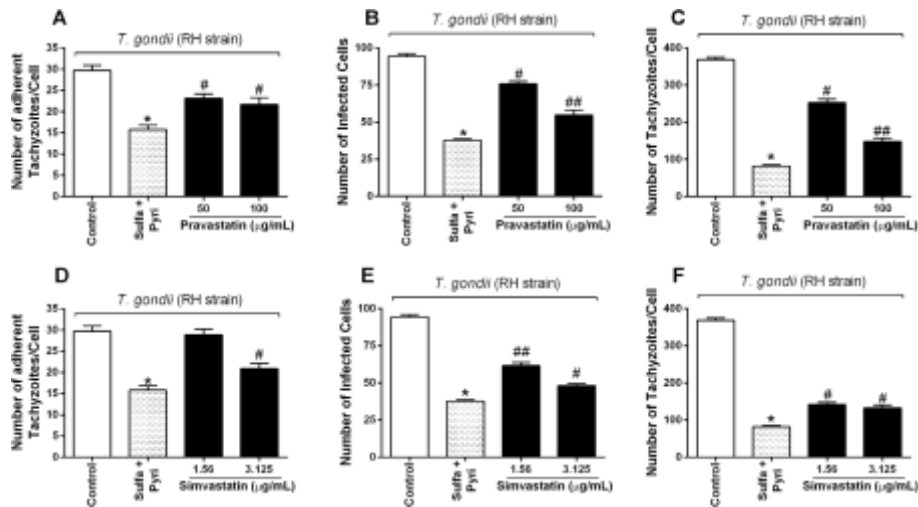
When evaluating the number of infected cells, we found a 20% (50 µg/mL) and 42% (100 µg/mL) reduction for tachyzoites pre-treated with pravastatin (Fig. 3B) and 35% (1.56 µg/mL) and 49% (3.125 µg/mL) for pre-treatment with simvastatin (Fig. 3E). Treatment with pyrimethamine and sulfadiazine combined (50 and 25 µg/mL, respectively) caused a 60% reduction when compared to the control (Fig. 3B and E).



**Fig. 1.** MTT cell viability assay in HeLa cells treated with pravastatin (panel A), simvastatin (panel B) and pyrimethamine and sulfadiazine combined (50 and 25 µg/mL, respectively) (panel C) for 24h. Cells treated with MCH were used as control. The data represent the percentage of viable cells. Three independent experiments were performed in triplicate (one-way ANOVA followed by Tukey's test). \* different from control ( $P \leq 0.05$ ).



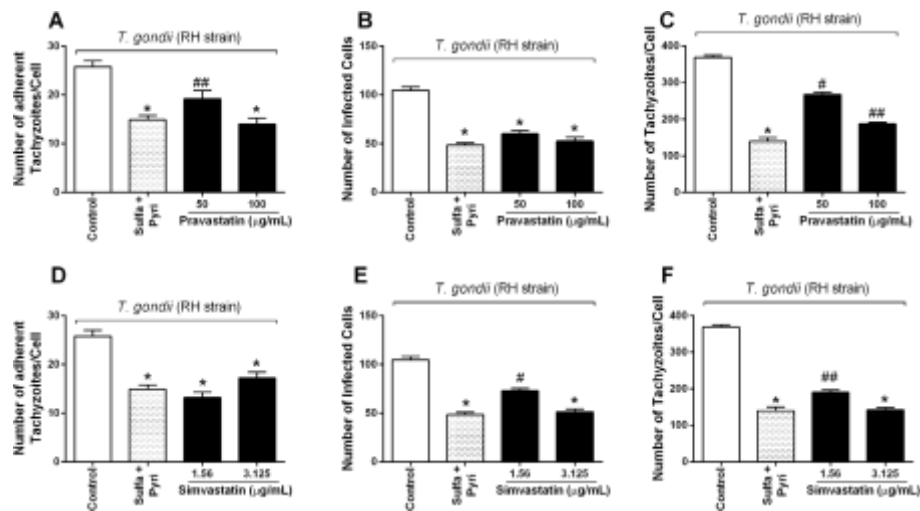
**Fig. 2.** Viability assessment of *T. gondii* pretreated with statins by trypan blue exclusion. *T. gondii* tachyzoites were pre-treated with pyrimethamine and sulfadiazine combined (50 and 25 µg/mL, respectively), pravastatin (A) and simvastatin (B) for 30 min. Tachyzoites treated with MCH were used as control. Results are expressed as percentage of viable tachyzoites (one-way ANOVA followed by Tukey's test).



**Fig. 3.** HeLa cells infected with *T. gondii* tachyzoites pre-treated with statins. After 30 min of treatment with pravastatin or simvastatin, HeLa cells were infected and evaluated for adhesion (A and D), number of infected cells (B and E) and intracellular proliferation of *T. gondii* (C and F). As a negative control, tachyzoites were treated only with RPMI, and as a positive control, they were treated with pyrimethamine and sulfadiazine (50 and 25 µg/mL, respectively). The data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate. \*Significantly different from the negative control ( $P \leq 0.001$ ). # Different from positive and negative control ( $P \leq 0.01$ ). ## Different from the negative and positive control, and different from 50 µg/mL pravastatin or 3.125 µg/mL simvastatin ( $P \leq 0.001$ ) (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

Most treatments with simvastatin and pravastatin, except 1.56 µg/mL simvastatin, were able to inhibit significantly the adhesion, invasion and proliferation of *T. gondii* compared to the control (infected and treated with RPMI) (Fig. 3A–E).

Regarding the proliferation of tachyzoites in HeLa cells, pravastatin caused a 32% decrease at 50 µg/mL and 60% decrease at 100 µg/mL compared to the control (Fig. 3C). Cells infected with tachyzoites pre-treated with simvastatin showed a reduction in proliferation of 62% (1.56 µg/mL) and 64% (3.125 µg/mL), signif-



**Fig. 4.** HeLa cells infected with *T. gondii* tachyzoites *in vitro* in post-treatment model with statins. In HeLa cells infected with *T. gondii* tachyzoites were treated for 24 h with pravastatin or simvastatin, adhesion (A and D), the number of infected cells (B and E) and intracellular proliferation (C and F) of *T. gondii* were evaluated. Tachyzoites treated with RPMI served as the negative control, and those treated with pyrimethamine and sulfadiazine (50 and 25 µg/mL, respectively) were the positive control. The data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate. \*Significantly different from the negative control ( $P \leq 0.001$ ). # Different from positive and negative control ( $P \leq 0.001$ ). ## Different from the negative and positive control, and different from 50 µg/mL pravastatin or 3.125 µg/mL simvastatin ( $P \leq 0.001$ ) (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

icantly differing from the control ( $P \leq 0.01$ ,  $P \leq 0.001$ ) (Fig. 3F). A 78% reduction in the number of parasites per cell was found when tachyzoites were pre-treated with pyrimethamine and sulfadiazine combined (50 and 25 µg/mL) (Fig. 3C–F) ( $P \leq 0.001$ ). Representative photomicrographs of HeLa cells infected with statins pre-treated *T. gondii* tachyzoites are represented in Fig. 5D–G.

#### 3.4. HeLa cells infected with *T. gondii* and then treated with pravastatin and simvastatin show reduced adhesion, infection and proliferation

In assessing the effect of post-treatment with simvastatin and pravastatin on the processes of adhesion, invasion and proliferation of *T. gondii*, we initially observed a reduction of 25 and 45% in the number of tachyzoites adhered per cell in post-treatment with 50 and 100 µg/mL pravastatin, respectively (Fig. 4A), and 49 and 33% with 1.56 and 3.125 µg/mL simvastatin, respectively. The conventional treatment caused a 42% reduction when compared to the negative control (Fig. 4D) ( $P \leq 0.001$ ).

In regard to infection, cells treated with 1.56 and 3.125 µg/mL simvastatin showed a decrease of 30 and 51%, respectively, when compared to the negative control (Fig. 4E) ( $P \leq 0.001$ ). In turn, treatment with pyrimethamine and sulfadiazine combined caused a 54% reduction in infection, while 50 and 100 µg/mL pravastatin resulted in a 42 and 50% decrease, compared to control (Fig. 4B) ( $P \leq 0.001$ ).

As to the proliferation of tachyzoites in HeLa cells, there was a 27 and 49% decrease when treated respectively with 50 and 100 µg/mL pravastatin ( $P \leq 0.001$ ) and 48 and 61% when treated respectively with 1.56 and 3.125 µg/mL simvastatin compared to the negative control (Fig. 4C and F) ( $P \leq 0.001$ ). The conventional treatment caused a 62% decrease when the infected cells were treated with pyrimethamine and sulfadiazine combined (50 and 25 µg/mL, respectively) ( $P \leq 0.001$ ) (Fig. 4C and F). Representative photomicrographs of HeLa cells infected with *T. gondii* post-treated with statins are represented in Fig. 5H–K.

#### 3.5. Pravastatin and simvastatin modulate levels of cytokines IL-6 and IL-17 in HeLa cells infected with *T. gondii* post treatment

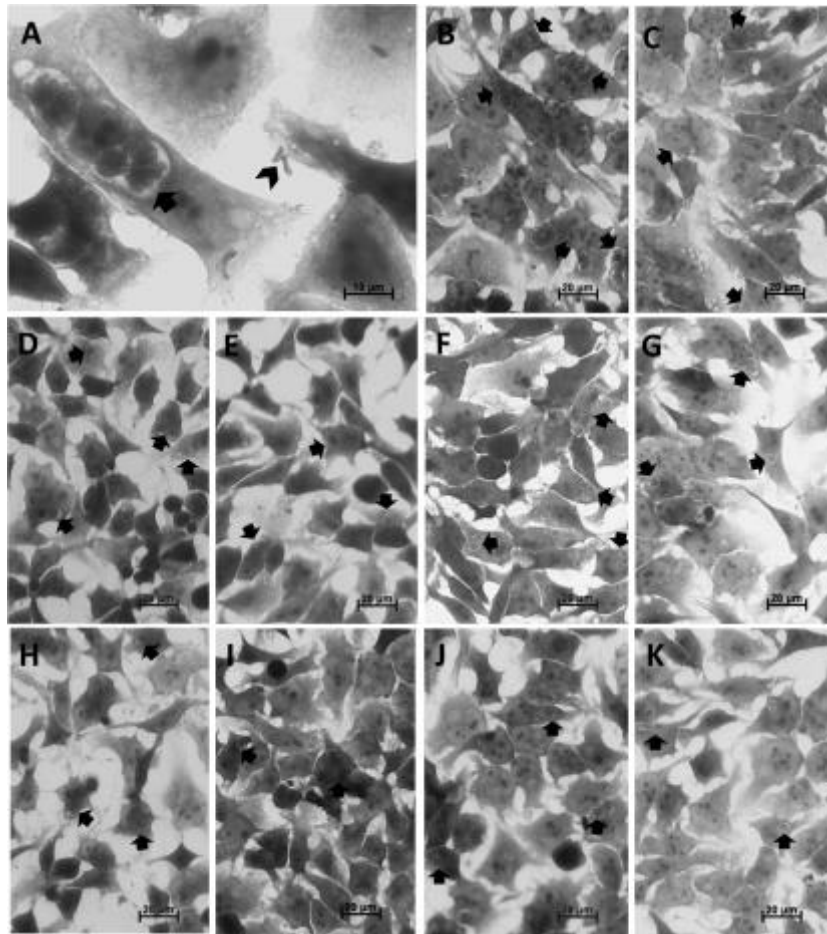
All treatments with pyrimethamine and sulfadiazine (50 and 25 µg/mL), pravastatin (50 and 100 µg/mL) and simvastatin (1.56 and 3.125 µg/mL), significantly reduced IL-6 and IL-17 compared to the infected control (Fig. 6). The other cytokines evaluated (IL-2, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) were not detected (data not shown).

## 4. Discussion

Statins are drugs used in lipid-lowering therapy, where they inhibit cholesterol synthesis via the mevalonate pathway, thereby impeding isoprenoid biosynthesis in humans (Nishikawa et al., 2011; Li et al., 2013). Knowing this, some researchers have begun to investigate their role as potential inhibitors of *T. gondii* replication (Cortez et al., 2009; Nishikawa et al., 2011; Li et al., 2013). In fact, with respect to toxoplasmosis, simvastatin (Cortez et al., 2009), atorvastatin (Li et al., 2013) and lovastatin (Nishikawa et al., 2011) have shown promising results.

Therefore, we decided to evaluate the activity of pravastatin and simvastatin in a model of experimental infection with *T. gondii* (RH strain) in HeLa cells, which had not been previously reported. The objective of determining the effect of pre-treatment was to see whether pravastatin and simvastatin acted directly on the parasite (via DOXP occurring in the apicoplast) (Coppens, 2014), since we know that statins can inhibit isoprenoid synthesis in the parasite, thereby inhibiting its replication (Li et al., 2013).

In fact, besides using lipid components synthesized in the apicoplast, *T. gondii* also uses lipid compounds of the host cell, and this also contributes to an indirect effect of statins (Li et al., 2013). Both pre- and post-treatment of the parasite with statins in the present study showed a significant reduction in the number of parasites attached to the HeLa cells, the number of infected cells and the inhibition of intracellular proliferation, suggesting the direct and indirect potential of these drugs against *T. gondii*.



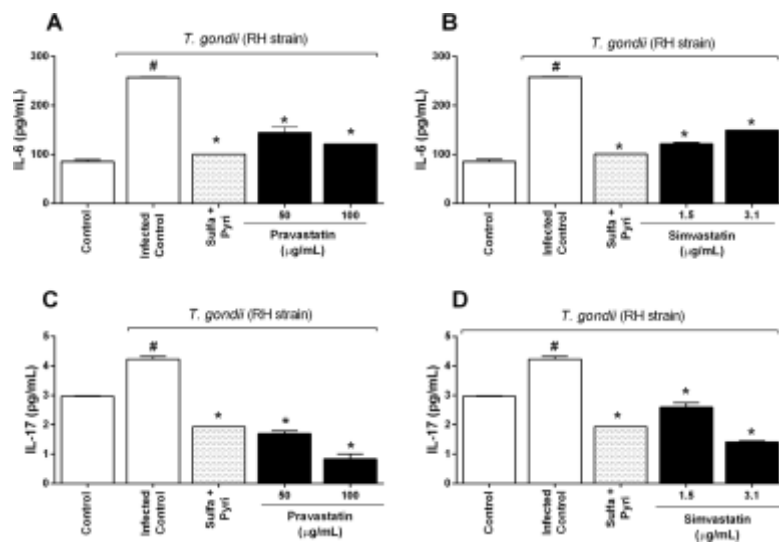
**Fig. 5.** Representative photomicrographs of HeLa cells infected with *T. gondii* tachyzoites in different statins treatment protocols using toluidine blue staining. (A) HeLa cells infected with *T. gondii* tachyzoites were evaluated as the adhesion (arrowhead), the number of infected cells and intracellular proliferation of *T. gondii* (arrow) (1000× magnification). (B) *T. gondii* infected HeLa cells (400× magnification). (C) Pyrimethamine and sulfadiazine (50 and 25 µg/mL, respectively) (400× magnification). (D) HeLa cells infected with pre-treated *T. gondii* tachyzoites with pravastatin 50 µg/mL, (E) 100 µg/mL or with simvastatin (F) 1.56 µg/mL and (G) 3.125 µg/mL (400× magnification). (H) HeLa cells infected with *T. gondii* tachyzoites post-treated with pravastatin 50 µg/mL, (I) 100 µg/mL or with simvastatin (J) 1.56 µg/mL and (K) 3.125 µg/mL (400× magnification).

Nair et al. (2011) demonstrated the essential role of the DOXP pathway in this protozoan using the RH strain of *T. gondii* *in vitro* with genetic deletions (knockouts) for two different stages of this pathway, preventing the synthesis of isopentenyl pyrophosphate (IPP) and its isomer dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP), which is consequently lethal to the parasite.

Additionally, since *T. gondii* is unable to synthesize sterols via the mevalonate pathway, it is believed that it incorporates and later metabolizes cholesterol of the host during infection for synthesis of its membranes, mainly of parasitophorous vacuoles (Coppens et al., 2000; Nishikawa et al., 2011). Along this line, Nishikawa et al. (2011) demonstrated that lovastatin caused a significant decrease in the proliferation of *T. gondii* in macrophages. With the same drug, Kessler et al. (2013) found that the microbicidal activity of macrophages infected with *T. cruzi* was increased, resulting in inhibition of parasite replication.

Similarly, Kückelhaus et al. (2013) demonstrated in their work that HMG-CoA reductase is essential to the survival of *Leishmania* spp. and that the use of inhibitors of this enzyme such as pravastatin caused a decrease in the mobility of the parasite and consequently its death.

Considering that *T. gondii* is an intracellular protozoan known to influence the resistance of the host and even to change the functions of several types of immune cells (Bernardes, 2006), we evaluated the post-infection cell-free medium from the proliferation assay for the production of the cytokines IL-6, IL-17, IL-2, IL-4, IL-10, TNF-α and IFN-γ. The treatment with statins significantly reduced the levels of IL-6 and IL-17 cytokines. In addition, the production of IL-2, IL-4, IL-10, TNF-α, IFN-γ was not detected in infected and/or treated cultures (data not shown). A similar result was observed in the group treated with sulfadiazine and pyrimethamine, drugs in current clinical use.



**Fig. 6.** Production of IL-6 and IL-17 in HeLa cells infected with *T. gondii* tachyzoites treated with statins. Levels of cytokines were measured by BD CBA in cell-free culture medium of infected HeLa cells and treated with pravastatin (50 and 100 µg/mL) (A and C) and simvastatin (1.56 and 3.125 µg/mL) (B and D) for 24 h. RPMI-treated HeLa cells served as the non-infected control, and HeLa cells infected with *T. gondii* tachyzoites were the infected control. HeLa cells infected with *T. gondii* and treated with pyrimethamine and sulfadiazine (50 and 25 µg/mL, respectively) were the positive control. \*Different from the infected control ( $P \leq 0.05$ ) (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

The immunomodulatory properties of statins are still controversial. Iwata et al. (2012) demonstrated that cytokines have anti-inflammatory effects, reducing IL-6 levels and IL-8 in lipopolysaccharide-stimulated human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) treated with pravastatin, while Churchward and Todd (2014) showed that treatment of primary cultured rat microglia with simvastatin increased levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Kuipers and Elsen (2007), also demonstrated that statins cause an increase in the gene expression of class II MHC molecules and consequently in antigen presentation and stimulation of immune cells.

Beaman (1994) found that the presence of IL-6 is directly related to the intracellular replication of *T. gondii*, confirming our finding of decreased IL-6 with reduction in intracellular proliferation. On the other hand, some studies have shown a dual role for IL-17, where it is related to both resistance to *T. gondii* and the development of the pathological picture (Kelly et al., 2005; Guiton et al., 2010), as well as early onset of infection in patients (Sauer et al., 2012). Possibly the decrease in IL-17 concentration is also linked to the reduction in IL-6 levels, since this cytokine, along with IL-23 and TGF- $\beta$ , is responsible for the secretion of IL-17 (Passos et al., 2010).

In general, it can be inferred that statins in our model had direct and indirect effects on the parasite through the DOXP and mevalonate pathways, reducing the adhesion ability, infection and proliferation of *T. gondii*, resulting in a decrease in the number of parasites; consequently, there would be a reduction in the immune response, resulting in a decrease in the synthesis of these cytokines (IL-6 and IL-17) responsible for the spread of the disease.

## 5. Conclusions

As far as we know, this is the first study that demonstrates the use of pravastatin in the *in vitro* treatment of infection by *T. gondii*. Additionally, the data confirm the potential use of simvastatin for the same purpose. Both treatments were effective in decreasing the adhesion ability, infection and proliferation of *T. gondii*, thus

opening new perspectives for the treatment of this serious disease, especially because they are drugs already on the market.

## Acknowledgements

This study was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Dr. A. Leyva (USA) helped with the English editing of the manuscript.

## References

- Anderson, A.C., 2005. Targeting DHFR in parasitic protozoa. *Drug Discov. Today* 15 (2), 121–128.
- Barbosa, B.F., et al., 2012. Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in both *in vitro* and *in vivo* experimental models. *Vet. Parasitol.* 187 (1–2), 44–52.
- Barbosa, M.A., et al., 2015. Potenciais alternativas terapêuticas em estudo para a toxoplasmose congênita: Uma revisão bibliográfica. *Rev. Patol. Trop.* 44 (1), 1–11.
- Beaman, M.H., 1994. Enhancement of intracellular replication of *Toxoplasma gondii* by IL-6. Interactions with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *J. Immunol.* 153 (10), 4583–4587.
- Bernardes, E.S., 2006. *Toxoplasma gondii* infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. *Am. J. Pathol.* 168 (6), 1910–1920.
- Bienvenu, A.L., Picot, S., 2008. Letters to editor: statins alone are ineffective in cerebral malaria but potentiate artesunate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11, 4203–4204.
- Blader, I.J., Saeji, J.P., 2009. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS* 117 (5–6), 458–476.
- Capobianco, J.D., 2014. Congenital toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 18 (4), 364–371.
- Churchward, M.A., Todd, K.G., 2014. Statin treatment affects cytokine release and phagocytic activity in primary cultured microglia through two separable mechanisms. *Mol. Brain* 7, 85.
- Coppens, I., Sinai, A.P., Joiner, K.A., 2000. *Toxoplasma gondii* exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J. Cell Biol.* 149 (1), 167–180.
- Coppens, I., 2013. Targeting, lipid biosynthesis and salvage in apicomplexan parasites for improved chemotherapies. *Nat. Rev. Microbiol.* 11 (12), 823–835.
- Coppens, I., 2014. Exploitation of auxotrophies and metabolic defects in *Toxoplasma* as therapeutic approaches. *Int. J. Parasitol.* 44 (2), 109–120.

- Cortez, E., et al., 2009. Statins inhibit *Toxoplasma gondii* multiplication in macrophages in vitro. *Int. J. Antimicrob. Agents* 33 (2), 185–186.
- Costa, I.N., et al., 2009. Azithromycin inhibits vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* (rodentia: cricetidae). *Placenta* 30 (10), 884–890.
- Denkers, E.Y., Gazzinelli, R.T., 1998. Regulation and function of t-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 569–588, 11.
- Dubey, J.P., et al., 2012. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 139 (11), 1375–1424.
- Dubey, J.P., et al., 2014. Epidemiology of toxoplasmosis in white tailed deer (*Odocoileus virginianus*): occurrence, congenital transmission, correlates of infection, isolation, and genetic characterization of *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 202 (3–4), 270–275.
- Garweg, J.G., Candolfi, E., 2009. Immunopathology in ocular toxoplasmosis: facts and clues. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (2), 211–220.
- Gazzinelli, R.T., Denkers, E.Y., 2006. Protozoan encounters with toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat. Rev. Immunol.* 6 (12), 895–906.
- Gobel, A., et al., 2007. Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Sci. Total Environ.* 1 (372), 361–371.
- Guiton, R., et al., 2010. Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. *J. Infect. Dis.* 202 (3), 427–435.
- Inaba, A., et al., 2014. Cerebral toxoplasmosis after umbilical cord blood transplantation diagnosed by the detection of anti-toxoplasma specific IgM antibody in cerebrospinal fluid. *Rinsho Ketsueki.* 55 (4), 456–460.
- Iwata, A., et al., 2012. Inhibitory effect of statins on inflammatory cytokine production from human bronchial epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 168 (2), 234–240.
- Kückelhaus, C.S., et al., 2013. Influence of long-term treatment with pravastatin on the survival, evolution of cutaneous lesion and weight of animals infected by *Leishmania amazonensis*. *Exp. Parasitol.* 127 (3), 658–664.
- Kawazoe, U., Mineo, J.R., 2011. *Toxoplasma gondii*. In: Neves, D.P. (Ed.), *Parasitologia Humana*, 12ª ed. Editora Atheneu, São Paulo, pp. 163–172.
- Kelly, M.N., et al., 2005. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.* 73, 617–621.
- Kessler, R.L., et al., 2013. Trypanosoma cruzi response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death. *PLoS One* 8 (1), e55497.
- Kuipers, H.F., Elsen, P.J., 2007. Immunomodulation by statins: inhibition of cholesterol vs. isoprenoid biosynthesis. *Biomed. Pharmacother.* 61 (7), 400–407.
- Lahmar, I., et al., 2009. Cytokine profiles in toxoplasmic and viral uveitis. *J. Infect. Dis.* 15 (199), 1239–1249.
- Li, Z.H., et al., 2013. *Toxoplasma gondii* relies on both host and parasite isoprenoids and can be rendered sensitive to atorvastatin. *PLoS Pathog.* 9 (10), 1–12.
- McAuley, J.B., 2014. Congenital toxoplasmosis. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.* 3 (1), 30–35.
- McFadden, G.I., 2011. The apicoplast. *Protoplasma* 248 (4), 641–650.
- Montoya, J.G., Remington, J.S., 2008. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin. Infect. Dis.* 15 (47), 554–566.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1, 55–63.
- Nair, S.C., et al., 2011. Apicoplast isoprenoid precursor synthesis and the molecular basis of fosmidomycin resistance in *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 208 (7), 1547–1559.
- Nishikawa, Y., et al., 2011. Host cholesterol synthesis contributes to growth of intracellular *Toxoplasma gondii* in macrophages. *J. Vet. Med. Sci.* 73 (5), 633–639.
- Nyilasi, I., et al., 2010. In vitro synergistic interactions of the effects of various statins and azoles against some clinically important fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 307, 175–184.
- Pahan, K., 2006. Lipid-lowering drugs. *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (10), 1165–1178.
- Passos, S.T., et al., 2010. IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. *J. Immunol.* 184 (4), 1776–1783.
- Qidwai, T., Khan, F., 2012. Antimalarial drugs and drug targets specific to fatty acid metabolic pathway of *Plasmodium falciparum*. *Chem. Biol. Drug Des.* 80 (2), 155–172.
- Ramakrishnan, S., et al., 2012. Apicoplast and endoplasmic reticulum cooperate in fatty acid biosynthesis in apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 287 (7), 4957–4971.
- Ramakrishnan, S., et al., 2013. Lipid synthesis in protozoan parasites: a comparison between kinetoplastids and apicomplexans. *Prog. Lipid Res.* 52 (4), 488–512.
- Sauer, A., et al., 2012. IL-17A as an effective target for anti-inflammatory and anti-parasitic treatment of toxoplasmic uveitis. *J. Infect. Dis.* 206 (8), 1316–1329.
- Seeber, F., Soldati-Favre, D., 2010. Metabolic pathways in the apicoplast of *Apicomplexa*. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 281, 161–228.
- Silveira, C., et al., 2015. Ocular involvement following an epidemic of *Toxoplasma gondii* infection in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. *Am. J. Ophthalmol.* 159 (6), 1013–1021.
- Strober, W., 2015. Current protocols in immunology trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* 2 (111), 1–3.

1 **3.2 SCIENTIFIC PRODUCTION**

2

3 **ARTICLE – 2**

4

5

6 **Proliferation of *T. gondii* (RH strain) is inhibited by the combination of**  
7 **pravastatin and simvastatin with conventional treatments used in**  
8 **toxoplasmosis**

9

10 **To be submitted for publication:**

11 **Corresponding address:**

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

1 **Proliferation of *T. gondii* (RH strain) is inhibited by the combination of pravastatin**  
2 **and simvastatin with conventional drugs used in toxoplasmosis**

3  
4 Raquel Arruda Sanfelice<sup>1</sup>, Larissa Rodrigues Bosqui<sup>1</sup>, Suelen Santos da Silva<sup>1</sup>, Milena  
5 Menegazzo Miranda-Sapla<sup>1</sup>, Luciano Aparecido Panagio<sup>2</sup>, Itamar Teodorico Navarro<sup>3</sup>,  
6 Ivete Conchon-Costa<sup>1</sup>, Wander Rogério Pavanelli<sup>1</sup>, Ricardo Sergio Almeida<sup>2</sup>, Idessania  
7 Nazareth Costa<sup>1\*</sup>.

8  
9 <sup>1</sup> Laboratório de Parasitologia Experimental - Departamento de Ciências Patológicas,  
10 Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

11  
12 <sup>2</sup>Laboratório de Micologia Médica e Microbiologia Bucal - Departamento de Microbiologia,  
13 Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

14  
15 <sup>3</sup>Laboratório de Zoonose e Saúde Pública - Departamento de Medicina Veterinária  
16 Preventiva, Universidade Estadual de  
17 Londrina, Paraná, Brasil.

18  
19  
20  
21  
22 \*Corresponding author:

23 Idessania Nazareth Costa

24 Departamento de Ciências Patológicas, CCB, Laboratório de Parasitologia Experimental,  
25 Universidade Estadual de Londrina, PR, Brazil - Rodovia Celso Garcia Cid Campus  
26 Universitário, Cx. Postal 6001, CEP 86051-990 - Londrina – PR. Tel: +055-43-3371-4539  
27 Email: [idessania@hotmail.com](mailto:idessania@hotmail.com)

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

## Abstract

*Toxoplasma gondii*, the etiologic agent of toxoplasmosis, is an obligate intracellular parasite that has as part of its metabolism, the production of essential precursors for its survival. Statins are drugs that inhibit cholesterol synthesis, blocking the conversion of the substrate HMG-CoA to mevalonate, thus preventing the initial processes of the biosynthesis of these precursors, both in humans and in the parasite. Objective. Under this assumption, we determined the effect of the combination of statins + pyrimethamine/sulfadiazine as a possible alternative treatment regimen for this infection. Methods. Cytotoxicity was evaluated in HeLa cells, using the MTT assay, where it was observed that the drug combinations did not affect cell viability. HeLa cells ( $10^5$ ) were then infected with *T. gondii* tachyzoites of the RH strain ( $5 \times 10^5$ ) and treated with pravastatin and/or simvastatin combined with pyrimethamine and/or sulfadiazine for 24 h. Results. our data showed a significant reduction in cell adhesion and infection and mainly parasite proliferation index with all treatments. Conclusion. On the basis of these results, the combination of statins with drugs used in current therapy showed promising potential, suggesting that this may be a therapeutic alternative for the treatment of toxoplasmosis.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, Combination of statins, HeLa cells.

## 1 Introduction

2

3 *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite belonging to the phylum  
4 Apicomplexa, and responsible for toxoplasmosis.<sup>[1]</sup> This protozoan is characterized by an  
5 apical complex of organelles including micronemes, rhoptries and dense granules  
6 participating in adhesion and cell invasion. In addition to these organelles, it also has  
7 another organelle called the apicoplast, in which the biosynthesis of fatty acids and  
8 isoprenoids occurs.<sup>[2,3]</sup>

9 Toxoplasmosis is often asymptomatic, but takes on a serious nature in  
10 immunocompromised patients,<sup>[4]</sup> congenital infection<sup>[5]</sup> and cases of uveitis.<sup>[6]</sup> Clinical  
11 manifestations are determined mostly by the immune profile of the host and the virulence  
12 of the strains of the parasite.<sup>[7]</sup>

13 In the gravest situations, the immune system is not sufficiently able to fight the  
14 parasite and can sometimes cause the death of the individual or result in serious  
15 sequelae. Thus, rapid diagnosis and early treatment has become increasingly important.

16 The recommended treatment for toxoplasmosis is the combination of pyrimethamine  
17 and sulfadiazine, which act synergistically in blocking the folate synthesis pathway,  
18 essential for the survival and replication of the parasite.<sup>[8]</sup> However this therapy has  
19 various side effects, including bone marrow suppression, which causes megaloblastic  
20 anemia, leukopenia and granulocytopenia.<sup>[9]</sup> To reduce such effects caused mainly by  
21 pyrimethamine, folinic acid is often concurrently administered,<sup>[8,9]</sup> though this measure  
22 cannot prevent much of the damage caused. Thus, studies aimed at identifying new drugs  
23 for toxoplasmosis therapy have been the subject of investigation.<sup>[10,11]</sup> Among these are  
24 particularly the studies with statins.<sup>[12-14]</sup>

25 In humans, statins are used as cholesterol-lowering agents, because they act  
26 primarily on the inhibition of cholesterol synthesis processes, blocking the activity of  
27 hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase and as a consequence, blocking the  
28 conversion of the substrate HMG-CoA to mevalonate; finally, the initial processes of  
29 isoprenoid biosynthesis are inhibited and, consequently, the synthesis of cholesterol.<sup>[15]</sup>  
30 Although *T. gondii* do not synthesize cholesterol, there is evidence demonstrating  
31 isoprenoid synthesis in a lipid pathway in the apicoplast of the parasite, which has been  
32 investigated as an important chemotherapeutic target because of its vital importance to the  
33 parasite.<sup>[16, 14, 17, 18]</sup>

1 Among the statins, pravastatin shows activity in the *Leishmania amazonensis*  
2 proliferation assay,<sup>[19]</sup> indicating that it has antileishmanial activity. Our data also revealed  
3 that both simvastatin and pravastatin used individually in an experimental infection model  
4 with the RH strain of *T. gondii* in HeLa cells had direct and indirect activity against the  
5 parasite (unpublished data).

6 Simvastatin<sup>[13]</sup> and the statin atorvastatin<sup>[20]</sup> have been evaluated in a culture assay  
7 of macrophages infected with *T. gondii*. Furthermore, Kessler et al.<sup>[21]</sup> found that treatment  
8 with lovastatin caused morphological changes in *T. cruzi* with consequent death.

9 In view of the above findings, we analyzed the effect of the combination of statin +  
10 pyrimethamine/sulfadiazine to propose an alternative treatment regimen for toxoplasmosis.

## 11 12 **Methods**

### 13 14 **HeLa cells Culture**

15  
16 HeLa cells derived from a human uterine cervix tumor were acquired from the  
17 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and were maintained in culture in  
18 Medical Mycology of Oral Microbiology Laboratory, State University of Londrina.

19 The cultivation was performed in 75-cm<sup>2</sup> culture flasks (Ciencor Scientific, Brazil)  
20 with RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., Brazil) supplemented with 10% inactivated  
21 fetal bovine serum (FBS) (Sigma Chemical Co.), 1% antibiotics (10,000 U/mL penicillin  
22 and 10 mg/mL streptomycin) (Cultilab, Brazil), L-glutamine, sodium pyruvate and 2-  
23 mercaptoethanol (complete medium for HeLa - CMH). The cells were maintained in an  
24 incubator at 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and used for experimental infection *in vitro* assays, as well as  
25 for maintenance of the RH strain of *T. gondii*.

### 26 27 **Maintenance of RH strain of *T. gondii***

28 Tachyzoites of *T. gondii* RH strain were maintained in cultured HeLa cells with  
29 CMH, with 2% instead of 10% FBS in an incubator at 5% CO<sub>2</sub> at 37°C, where successive  
30 passages were done to keep the parasite *in vitro*.<sup>[22]</sup>

### 31 32 **Pravastatin and simvastatin**

33

1 Pravastatin, obtained from Laboratório Catarinense SA (Joinville, Brazil), was  
2 diluted in distilled water at 12.8 mg/mL. Simvastatin, obtained from the same company,  
3 was diluted in 0.25 M NaOH at 5 mg/mL and warmed at 37°C for 1 h with pH adjusted to  
4 7.4 to cleave the pre-drug and release the active drug.<sup>[23]</sup>

#### 6 **2.4 HeLa cell viability by MTT assay**

7  
8 The viability of HeLa cells after treatment with pravastatin and simvastatin was  
9 evaluated according to mitochondrial oxidation, by colorimetric MTT tetrazolium salt assay  
10 (3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) (Sigma  
11 Chemical Co.).<sup>[24]</sup> HeLa cells were grown in 96-well plates (3x 10<sup>4</sup> cells/well/200 µL), for  
12 24 h in MCH medium at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Afterwards, the cells were treated with the  
13 combination sulfadiazine (50 µg/mL) + pyrimethamine (25 µg/mL) used as the positive  
14 control; pravastatin (12 µg/mL) + simvastatin (3.125 µg/mL); pravastatin (12 µg/mL) +  
15 pyrimethamine (8 µg/mL); pravastatin (12 µg/mL) + sulfadiazine (16 µg/mL); pravastatin  
16 (12 µg/mL) + pyrimethamine (8 µg/mL) + sulfadiazine (16 µg/mL); simvastatin (3.125  
17 µg/mL) + pyrimethamine (8 µg/mL); simvastatin (3.125 µg/mL) + sulfadiazine (8 µg/mL);  
18 simvastatin (3.125µg/mL) + pyrimethamine (8 µg/mL) + sulfadiazine (16 µg/mL)  
19 (Laboratório Catarinense SA). The treated cells were maintained in CO<sub>2</sub> incubator at 37°C  
20 for 24 h.

21 Cells with only culture medium served as the negative control. After the treatments,  
22 the medium was replaced with fresh medium with 10 µL of MTT (5 mg/mL) and the cells  
23 incubated for another 3 h under the usual conditoins. The medium was removed and the  
24 crystals solubilized in 10% sodium dodecy sulfate (SDS) (Sigma Chemical Co.) in 50%  
25 dimethyl formamide (DMF) (Sigma Chemical Co.). After 30 min, absorbance was read at  
26 570 nm in a microplate reader (Thermo Placa Thermo Plate - TP-Reader). The results  
27 were expressed as a percentage relative to MTT reduction in the control group calculated  
28 with following formula:

29  $\% \text{ viable cells} = (\text{Abs of treated cells} / \text{Abs of nontreated cells}) \times 100.$

#### 31 **Experimental infection**

32

1 The effect of pravastatin and simvastatin on adhesion, invasion and intracellular  
2 proliferation of *T. gondii* in HeLa cells was evaluated using an experimental infection with  
3 tachyzoites of *T. gondii* in HeLa cells with post treatment.

4 Briefly, HeLa cells ( $10^5$ ) maintained in 24-well plates containing 13-mm round  
5 coverslips (Ciencor Scientific) were infected with  $5 \times 10^5$  tachyzoites of the *T. gondii*. RH  
6 strain. After 3 h of infection, the cells were washed and subjected to the following treatments:

- 7 • sulfadiazine (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + pyrimethamine (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );
- 8 • pravastatin (12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + simvastatin (3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );
- 9 • pravastatin (12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + pyrimethamine (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );
- 10 • pravastatin (12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + sulfadiazine (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );
- 11 • pravastatin (12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + pyrimethamine (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + sulfadiazine (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );
- 12 • simvastatin (3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + pyrimethamine (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );
- 13 • simvastatin (3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + sulfadiazine (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );
- 14 • simvastatin (3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + pyrimethamine (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + sulfadiazine (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

15 Cells were fixed in 10% paraformaldehyde in PBS (phosphate-buffered saline) for  
16 24 h and washed in PBS to remove nonfixed material. Cells were stained with  
17 1% toluidine blue (Sigma Chemical Co.) for 5 min and mounted on glass slides for  
18 examination under a light microscope (e100, Nikon – led). We determined the *T. gondii*  
19 infection index (number of infected cells per 200 cells examined), number of tachyzoites of  
20 *T. gondii* adhered per cell and intracellular proliferation of the parasite (total number of  
21 parasites per 200 cells examined).<sup>[22]</sup>

## 23 **Statistical analysis**

24  
25 All data are given as the mean and standard deviation of three independent  
26 experiments carried out in triplicate. The differences between treatments and controls  
27 were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple  
28 comparison test, using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA,  
29 USA). Statistical significance was considered when  $P < 0.05$ .

## 31 **Results**

### 32 **HeLa cell viability by MTT assay**

33

1 To see if the combinations were toxic to HeLa cells, we tested the possible  
2 concentrations that would be used in infection experiments, by the MTT assay. Initially, we  
3 used the pyrimethamine and sulfadiazine concentrations established by Barbosa et al.  
4 (2012). We observed that HeLa cells treated with the combination of pravastatin (12  
5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + pyrimethamine (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + sulfadiazine (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 h did not affect cell  
6 viability compared to the positive control (Fig. 1A). The same was observed in cells treated  
7 with simvastatin (3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) combined with pyrimethamine (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + sulfadiazine (16  
8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Fig. 1B). When we evaluated the combination of pravastatin + simvastatin, there  
9 was only a 6.3% decrease in cell viability, not differing from control (Fig. 1C).

### 10 **Pravastatin and simvastatin inhibit adhesion, invasion and intracellular proliferation** 11 **of *T. gondii* in HeLa cells**

12  
13  
14 We determined the effects of the combinations on the processes of adhesion,  
15 invasion and proliferation of *T. gondii* tachyzoites using the infection model after the  
16 treatments. It was observed that most of the treatments significantly reduced adhesion by  
17 the parasite compared to the negative control (treated with only RPMI) except when the  
18 cells were treated with the combination of pravastatin (12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + sulfadiazine (16  
19  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $P=0.0001$ ) (Fig. 2A).

20 A significant reduction was also observed in the number of cells infected and  
21 treated with the following combinations of pravastatin + pyrimethamine, pravastatin +  
22 sulfadiazine, and pravastatin + pyrimethamine + sulfadiazine, compared to the negative  
23 control ( $P=0.0001$ ) (Fig. 2B). When compared to the positive control (pyrimethamine (25  
24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + sulfadiazine (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )), similar results were observed for the combinations of  
25 pravastatin (12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + pyrimethamine (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and pravastatin (12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) +  
26 pyrimethamine (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) + sulfadiazine (16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ( $P=0.0001$ ) (Fig. 2B).

27 There was also a significant reduction in the number of tachyzoites per cell when  
28 with all combinations of drugs compared to the negative control ( $P=0.0001$ ) (Fig. 2C).  
29 However, when compared to the positive control, the combinations of pravastatin (12  
30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + pyrimethamine (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ( $P=0.0001$ ), pravastatin (12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + sulfadiazine (16  
31  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ( $P=0.001$ ) and pravastatin (12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + pyrimethamine (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) + sulfadiazine (16  
32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ( $P=0.0001$ ) showed decreased levels of tachyzoites (Fig. 2C).

1            However, treatment with pravastatin (12 µg/mL) alone showed no significant  
2 reduction in the number of infected cells and the number of tachyzoites per cell when  
3 compared to the negative and positive controls (Fig. 2B and C).

4  
5            We found that simvastatin (3.1 µg/mL) alone ( $P=0.0001$ ) and/or combined with  
6 pyrimethamine (8 µg/mL) + sulfadiazine (16 µg/mL) ( $P=0,05$ ) and also simvastatin and  
7 pyrimethamine ( $P=0.05$ ), significantly decreased the number of tachyzoites adhered to  
8 cells when compared to the negative control (Fig. 3A). However, the combinations of  
9 simvastatin (3.1 µg/mL) + pyrimethamine (8 µg/mL), simvastatin (3.1 µg/mL) + sulfadiazine  
10 (16 µg/mL), and simvastatin (3.1 µg/mL) + pyrimethamine (8 µg/mL) + sulfadiazine (16  
11 µg/mL), were not effective in eliminating the adhered tachyzoites when compared to the  
12 positive control ( $P=0.0001$ ) (Fig. 3A).

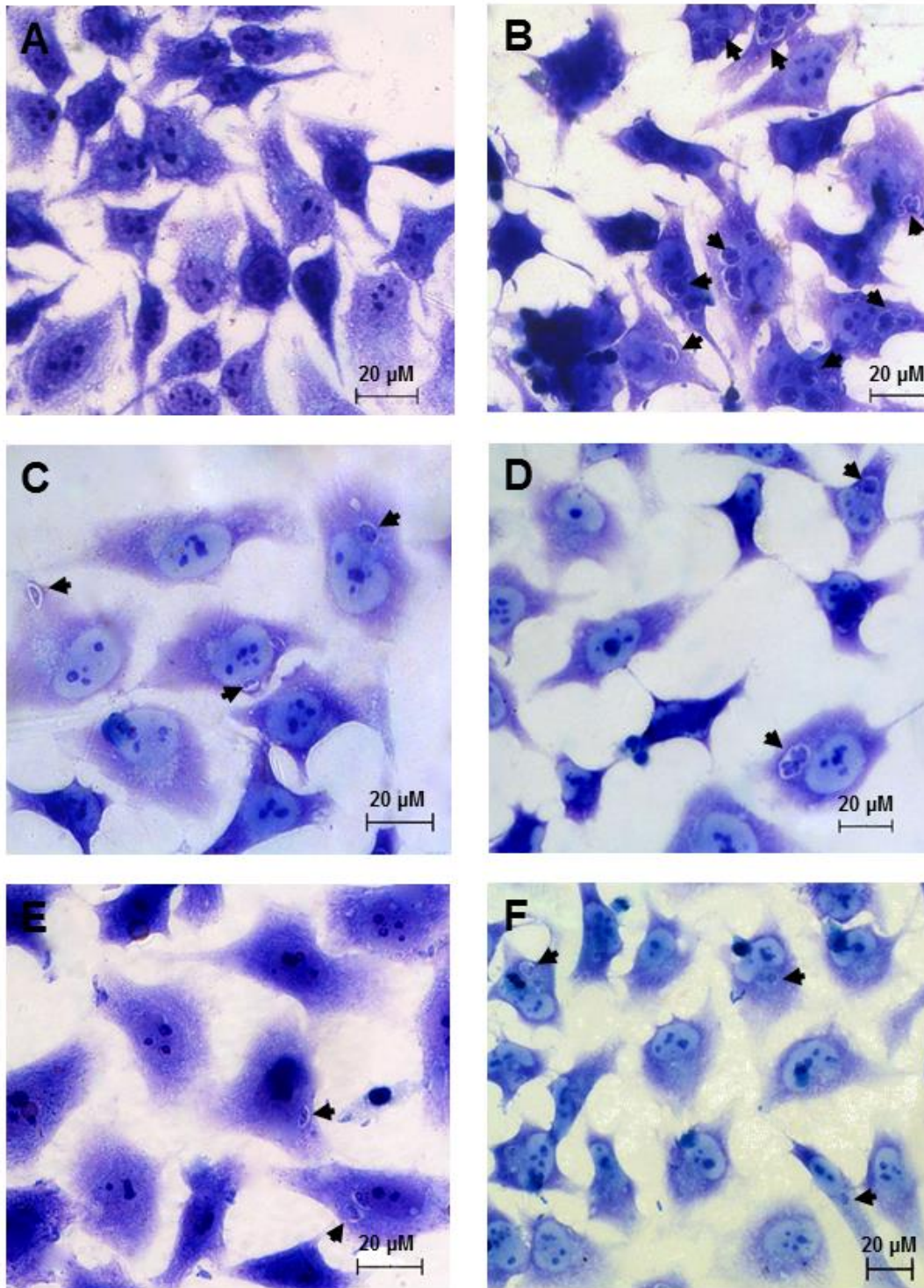
13            In turn, all treatments caused a significant decrease in the number of infected cells  
14 (Fig 3B) and number of tachyzoites per cells (Fig 3C), compared to the negative control  
15 ( $P=0.0001$ ).

16            In addition, the number of parasites was significantly lower compared to the positive  
17 control, when the cells were treated with the combination of simvastatin (3.1 µg/mL) +  
18 pyrimethamine (8 µg/mL) + sulfadiazine (16 µg/mL) ( $P=0.001$ ) (Fig. 3C).

19  
20            The figure 4 shows that the combination of pravastatin + simvastatin significantly  
21 decreased adhesion (Fig. 4A), number of infected cells (Fig. 4B) and number of  
22 tachyzoites per cell ( $P=0.0001$ ) (Fig. 4C), when compared to the negative control. This  
23 was not observed when compared to the positive control.

24            The supplementary Fig. 5 shows light microscopy images of the following: uninfected  
25 HeLa cells (5A), demonstrating the absence of *T. gondii*; HeLa cells infected with the RH  
26 strain of *T. gondii* (5B), where the arrows indicate the presence of parasitophorous  
27 vacuoles containing the parasite tachyzoites; HeLa cells infected and treated with the  
28 combination of sulfadiazine + pyrimethamine (5C) showing a decrease in the number of  
29 intracellular parasites; HeLa cells treated with pravastatin + pyrimethamine + sulfadiazine  
30 (5D), where the arrows show a great decrease in the number parasites and  
31 parasitophorous vacuoles; and HeLa cells treated with simvastatin + pyrimethamine +  
32 sulfadiazine (5E) and pravastatin + simvastatin (5F), both also showing a decrease in the  
33 number of intracellular parasite.

34            **Images**



1  
2  
3 **Figure 5.** Photomicrograph of experimental infection in HeLa cells treated for 24 h and stained with toluidine  
4 blue. Uninfected HeLa cells (A), HeLa cells infected with the RH strain of *Toxoplasma gondii* (B). HeLa cells  
5 infected with *T. gondii* and treated with pyrimethamine and sulfadiazine combined (50 and 25 µg/mL) (C);  
6 HeLa cells infected with *T. gondii* and treated with a combination of pravastatin (12 µg/mL), pyrimethamine  
7 (8 µg/mL) and sulfadiazine (16 µg/mL) (D); simvastatin (3.125 µg/mL), pyrimethamine (8 µg/mL) and  
8 sulfadiazine (16 µg/mL) (E); pravastatin (12 µg/mL) and simvastatin (3.125 µg/mL) (F). Arrows indicate a

1 parasitophorous vacuole with tachyzoites inside. Were analyzed by optical microscope (magnification of  
2 400x in all panels)

3

#### 4 **Discussion**

5 Our results showed a significant reduction in the processes of *T. gondii* adhesion to  
6 HeLa cells, number of infected cells, and especially intracellular parasite proliferation rate  
7 in cells treated with pravastatin and / or simvastatin combined with sulfadiazine and  
8 pyrimethamine.

9 It was also seen that the combination of pravastatin with conventional drugs  
10 (pyrimethamine and sulfadiazine) caused up to 91% reduction in the number of  
11 tachyzoites per cell when using concentrations below those normally indicated for  
12 pyrimethamine and sulfadiazine. This information is important since it is expected that  
13 lower doses of pyrimethamine and sulfadiazine would be less toxic to the host.

14 Importantly, there are no reports in the literature about the activity of pravastatin in  
15 *T. gondii* infection, and there is only one previous study by our group that showed that the  
16 drug was effective in controlling *T. gondii* replication in HeLa cells when used alone at 50  
17 and 100 µg / mL (unpublished data).

18 The search for new therapies for the treatment of toxoplasmosis has been the  
19 subject of many studies. In this regard, some researchers have studied the potential of  
20 statins, drugs used for the treatment of dyslipidemia, and have found that these drugs also  
21 showed promising activity against toxoplasmosis.<sup>[13,14,20]</sup>

22 Therefore, in attempt to minimize the side effects caused by current therapy, our  
23 study was to evaluate the effect of the combination of pravastatin/simvastatin with  
24 conventional treatment at lower concentrations. Initially, we observed that the  
25 combinations (statin + pyrimethamine/sulfadiazine at lower concentrations) did not alter  
26 cell viability.

27 All forms of combination related to simvastatin decreased the number of infected  
28 cells, mainly when using lower concentrations than that of sulfadiazine and pyrimethamine  
29 combined. This result corroborates the data obtained in a previous study of HeLa cells,  
30 where we demonstrated that simvastatin also reduced the number of infected cells and the  
31 number of intracellular parasites, when used alone but at higher concentrations  
32 (unpublished data).

33 Cortez et al.<sup>[13]</sup> observed that simvastatin had anti-proliferative activity against  
34 tachyzoite forms of the RH strain in macrophage culture. Our data with pravastatin +

1 simvastatin combined showed similar effects with regard to this activity, but using HeLa  
2 cells.

3 By knowing that statins inhibit cholesterol synthesis in the host by blocking HMG-  
4 CoA reductase enzyme and the conversion of HMG-CoA to mevalonic acid,<sup>[15]</sup> and that *T.*  
5 *gondii* also uses sources of cholesterol of the host for maintenance and survival in the cell,  
6 we hypothesized that treatment with these drugs could indirectly eliminate the parasite, by  
7 depriving it of essential constituents for their maintenance and survival.<sup>[20]</sup>

8 To prove that cholesterol produced by the host is essential to the life and replication  
9 of *T. gondii*, Nishikawa et al. <sup>[14]</sup> pre-treated murine macrophages with lovastatin and  
10 initially found that cholesterol levels were dramatically reduced and that this was directly  
11 related to the inhibited proliferation of the parasite.

12 It is noteworthy that the results obtained with the combination simvastatin +  
13 pravastatin indicated that in addition to the indirect pathway, there was direct action on the  
14 apicoplasto.<sup>[20]</sup>

15 Kessler et al.<sup>[21]</sup> using lovastatin also demonstrated its microbicidal action in an  
16 infection model with *T. cruzi*, reporting that there was also a dose-dependent inhibitory  
17 effect on parasite replication.

18 We believe that the decrease in the intracellular proliferation of *T. gondii* using  
19 different combinations was likely due to the concomitant use of drugs (statins + current  
20 therapy) with different mechanisms of action, i.e., inhibition of lipid synthesis and blocking  
21 folate synthesis, respectively.<sup>[8]</sup>

22

## 23 **Conclusion**

24 Our findings with statins alone are extremely important since treatment with  
25 simvastatin and pravastatin was more effective than the use of conventional therapy  
26 (pyrimethamine and sulfadiazine), even at lower concentrations than that of current  
27 therapy. Thus, pravastatin and simvastatin appear to be promising drugs for use in clinical  
28 trials as an alternative treatment for toxoplasmosis. This study, according to the literature,  
29 is a promising pioneer work, because in fact, the combinations caused a reduction in cell  
30 adhesion and invasion and decreased proliferation of the parasite as well. It is believed  
31 that these drugs together act on important targets for replication and survival of the  
32 parasite, either directly by inhibiting DNA synthesis of the parasite or indirectly by  
33 suppressing lipid supply.

34

## 1 Acknowledgements and Funding

2 This work was supported by grants from the Coordenação de aperfeiçoamento de  
3 Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## 4 5 References

- 6  
7 1. CENCI-GOGA BT *et al.* *Toxoplasma* in Animals, Food, and Humans: An Old Parasite of  
8 New Concern. *Foodborne Pathog and Dis.* 2011; 8: 751-762.
- 9 2. CARRUTHERS VB, TOMLEY FM. Microneme proteins in apicomplexans. *Subcellular*  
10 *Biochemistry*, 2008; 47: 33-45.
- 11
- 12 3. SEEBER F, SOLDATI-FAVRE D. Metabolic Pathways in the Apicoplast of Apicomplexa.  
13 *Int Rev Cell Mol Biol.* 2010; 281: 161-228.
- 14 4. KAWAZOE U, MINEO JR. *Toxoplasma gondii*. In: Neves DP. *Parasitologia humana*,  
15 2011; 12ª edição, São Paulo: Atheneu, 163-172.
- 16
- 17 5. McAULEY J. B. Congenital Toxoplasmosis. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2014; 3: 30-35.
- 18
- 19 6. SILVEIRA C *et al.* Ocular Involvement Following an Epidemic of *Toxoplasma gondii*  
20 Infection in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. *Am J Ophthalmol.* 2015; 159: 1013-1021.
- 21
- 22 7. HUNTER CA, SIBLEY LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma*  
23 *gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol.* 2012; 10: 766-778.
- 24
- 25 8. ANDERSON AC. Targeting DHFR in parasitic protozoa. *Drug discov today*, 2005; 10:  
26 121-128.
- 27
- 28 9. PETERSEN E. Toxoplasmosis. *Semin Fetal Neonatal Med. Netherlands*, 2007; 12:  
29 214-223.
- 30
- 31 10. COSTA IN *et al.* Azithromycin Inhibits Vertical Transmission of *Toxoplasma gondii* in  
32 *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). *Placenta*, 2009; 30: 884-890.
- 33 11. BARBOSA MA *et al.* Potenciais alternativas terapêuticas em estudos para a  
34 toxoplasmose congênita: Uma revisão bibliográfica. *Rev Patol Trop.* 2015; 44: 1-11.
- 35 12. MASON RP. Molecular Basis of Differences Among Statins and a Comparison with  
36 Antioxidant Vitamins. *Am J Cardiol.* 2007; 98: 34-41.
- 37
- 38 13. CORTEZ E *et al.* Statins inhibit *Toxoplasma gondii* multiplication in macrophages *in*  
39 *vitro*. *Int J Antimicrob Agents*, 2009; 33: 185-186.
- 40
- 41
- 42 14. NISHIKAWA Y *et al.* Host cholesterol synthesis contributes to growth of intracellular

- 1 *Toxoplasma gondii* in macrophages. *J Vet Med Sci.* 2011; 73: 633-639.
- 2
- 3 15. GARCÍA-SABINA A *et al.* Consideraciones específicas en la prescripción e  
4 intercambio terapéutico de estatinas. *Farm Hosp.* 2012; 36: 97-108.
- 5 16. LIM L *et al.* The carbon and energy sources of the non-photosynthetic plastid in the  
6 malaria parasite. *FEBS Lett.* 2010; 584: 549-554.
- 7
- 8 17. QIDWAI T, KHAN F. Antimalarial drugs and drug targets specific to fatty acid metabolic  
9 pathway of *Plasmodium falciparum*. *Chem Biol & Drug Des.* 2012; 80: 155-172.
- 10
- 11 18. COPPENS I. Exploitation of auxotrophies and metabolic defects in *Toxoplasma* as  
12 therapeutic approaches. *Int J Parasitol.* 2014; 44: 109-120.
- 13
- 14 19. KÜCKELHAUS CS *et al.* Influence of long-term treatment with pravastatin on the  
15 survival, evolution of cutaneous lesion and weight of animals infected by *Leishmania*  
16 *amazonensis*. *Exp Parasitol.* 2013; 127: 658-664.
- 17
- 18 20. LI ZH *et al.* *Toxoplasma gondii* relies on both host and parasite isoprenoids and can be  
19 rendered sensitive to atorvastatin. *PLoS Pathog.* 2013; 9: 1-12.
- 20
- 21 21. KESSLER *et al.* Trypanosoma cruzi response to sterol biosynthesis inhibitors:  
22 morphophysiological alterations leading to cell death. *PLoS One*, 2013; 8: e55497.
- 23
- 24 22. BARBOSA BF *et al.* Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in  
25 both in vitro and in vivo experimental models. *Vet Parasitol.* 2012; 187: 44-52.
- 26 23. NYILASI I *et al.* *In vitro* synergistic interactions of the effects of various statins and  
27 azoles against some clinically important fungi. *FEMS Microbiol Lett.* 2010; 307: 175-184.
- 28 24. MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to  
29 proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983; 16: 55-63.

30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42