

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia**  
**Aplicadas**

**Avaliação dos efeitos *in vitro* e *in vivo* do extrato total  
de *Artemisia annua* L. no controle da infecção aguda  
por *Toxoplasma gondii***

**TAÍSA CARRIJO DE OLIVEIRA**

**UBERLÂNDIA - MG**

**2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**Avaliação dos efeitos *in vitro* e *in vivo* do extrato total  
de *Artemisia annua* L. no controle da infecção aguda  
por *Toxoplasma gondii***

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-Graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas da  
Universidade Federal de Uberlândia como  
parte dos requisitos para obtenção do título  
de Mestre.

**TAÍSA CARRIJO DE OLIVEIRA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ROBERTO MINEO**

**CO-ORIENTADORA: Dra. DEISE APARECIDA DE OLIVEIRA SILVA**

**UBERLÂNDIA - MG**

**2007**

Esse trabalho é o resultado de muita perseverança,  
o qual dedico especialmente aos meus pais,  
Quintino de Oliveira Rosa e Elvira Helena Carrijo de Oliveira,  
à minha irmã, Talita Carrijo de Oliveira  
e ao meu marido, Luciano Camargos.

“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais volta ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

Toda manhã na África, uma gazela acorda  
Ela sabe que terá que correr mais do que o leão, ou morrerá.  
Toda manhã na África, um leão acorda  
Ele sabe que terá que correr mais que a gazela ou também morrerá.  
Quando o sol surge, não importa se você é leão ou gazela  
é bom começar a correr

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**,

por iluminar minhas escolhas ajudando-me a seguir sempre em frente, com coragem, amor e persistência. Por ter colocado em minha vida pessoas maravilhosas, sem as quais eu não estaria onde hoje estou.

Aos meus pais, **Quintino e Elvira Helena**,

por sempre estarem ao meu lado ensinando-me a ser justa e honesta, pelo amor incondicional que me fez superar momentos de muitas dificuldades e sempre seguir em frente, nunca me esquecendo de quem sou.

A minha irmã **Talita**,

pelos momentos de alegria, sem a qual minha vida seria muito mais penosa e triste.

Ao meu marido **Luciano**,

pela paciência, carinho, compreensão e cumplicidade nos momentos de dificuldades, por todas as alegrias que proporciona trazendo mais luz a minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **José Roberto Mineo**,

por acreditar em mim, permitindo que este trabalho fosse desenvolvido, pelos incontestáveis conhecimentos adquiridos, pelas contribuições durante a realização deste trabalho, paciência, ética e atenção nos momentos de dificuldades.

À minha co-orientadora, Dra. **Deise Aparecida O. Silva**,

pela indiscutível contribuição, pelos ensinamentos, boa vontade no esclarecimento de dúvidas, pelas idéias, paciência, atenção e amizade durante toda realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colaboradores, **Bellisa de F. Barbosa, Cristina Rostkowska  
Dâmaso Pacheco e Samantha Ribeiro Béla**

pela grande ajuda na execução dos procedimentos experimentais, pela disposição em deixar seus próprios trabalhos para me auxiliar, pela amizade e carinho.

## AGRADECIMENTOS

A todos os Professores do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia, especialmente as professoras Dra. Eloísa Amália V. Ferro, Dra. Janethe Pena e Neide Maria Silva pela cooperação e contribuição dadas ao trabalho.

À amiga Flávia Andrade Chaves Borges, pelos ensinamentos práticos e lições de vida.

Aos amigos e companheiros Laboratório de Imunologia e parasitologia: Ana Cláudia, Celene, Gabriele Garcias, Mariana, Marina, Hugo e Pablo, pelo excelente convívio neste período, pelas contribuições e pelos bons momentos compartilhados no dia-a-dia do laboratório.

Aos amigos e companheiros de convívio do laboratório de alergia: Cristiane, Jorge Karine, Leandro, Priscilla, Rafael e Ronaldo pelos bons e alegres momentos de convivência no laboratório.

Às “meninas” do laboratório de Histologia: Angélica, Carla, Mariana e Idessânia pelo auxílio na realização de alguns experimentos e pela amizade.

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia, Andréia, Márley, Tomáz (Junão) e Zilda por contribuir com a limpeza e esterilização dos materiais utilizados, pelo cuidado com os animais de experimentação e pelos momentos de descontração.

Aos secretários do Laboratório de Imunologia, Max, e da Pós-graduação, João Neto e Lucileide, pela atenção e boa vontade na solução dos nossos problemas.

Às minhas grandes amigas, Ananda Vicentini, Carla Duque, Bellisa F. Barbosa e Rúbia Mara que sempre estiveram ao meu lado, pelo incontestável companheirismo e amizade.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro fornecido à aquisição de material e reagentes para a execução deste trabalho, em especial à *CAPES* pela bolsa de auxílio financeiro oferecidas durante este curso.

## SUMÁRIO

Resumo.....	VII
Abstract.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	12
1.2 Características morfológicas e ultraestruturais.....	12
1.3 Linhagens clonais de <i>T. gondii</i> .....	15
1.4 Estágios evolutivos e Ciclo biológico.....	17
1.5 Antígenos de superfície.....	20
1.6 Interação parasita-hospedeiro.....	22
1.7 Resposta imune.....	23
1.7.1 Imunidade celular.....	24
1.7.2 Imunidade humoral.....	26
1.8 Transmissão.....	27
1.9 A Toxoplasmose.....	28
1.9.1 Indivíduos imunocompetentes.....	28
1.9.2 Toxoplasmose ocular.....	29
1.9.3 Indivíduos imunocomprometidos.....	29
1.9.4 Toxoplasmose congênita.....	30
1.10 Diagnostico.....	31
1.10.1 Métodos diretos.....	31
1.10.2 Métodos indiretos.....	32
1.11 Epidemiologia.....	36
1.12 Tratamento.....	37
1.13 <i>Artemisia annua</i> L.....	40
1.14 Artemisinina.....	42
1.15 Mecanismo de ação em <i>Plasmodium</i> sp e toxicidade.....	43
1.16 Efeito da Artemisinina contra <i>T. gondii</i> .....	44
1.17 Utilização do chá de <i>A. annua</i> .....	45
2. OBJETIVOS.....	47
2.1 Objetivo Geral.....	47

2.2	Objetivos específicos.....	47
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1	Animais.....	48
3.2	Cultura de células.....	48
3.3	Parasitas.....	49
3.4	Drogas.....	49
3.5	Ensaio de citotoxicidade.....	50
3.6	Efeito das drogas na infecção por <i>T. gondii in vitro</i> .....	51
3.7	Efeito das drogas na infecção por <i>T. gondii in vivo</i> .....	52
3.8.	Ensaio de Imunohistoquímica.....	53
3.9.	Bioensaio em camundongo.....	54
3.10.	PCR para detecção de DNA de <i>T. gondii</i> .....	54
3.11	Determinação da produção de nitrito e citocinas.....	55
3.12.	Análise Estatística.....	56
4.	RESULTADOS.....	57
4.1.	Atividade citotóxica do extrato total de <i>A. annua</i> .....	57
4.2.	Efeito do extrato total de <i>A. annua</i> na infecção <i>in vitro</i> por <i>T. gondii</i> .....	58
4.2.1.	Pré-tratamento de taquizoítas de <i>T. gondii</i> com extrato total de <i>A. annua</i> ou sulfadiazina antes da infecção de fibroblastos humanos.....	58
4.2.2.	Tratamento com extrato total de <i>A. annua</i> ou sulfadiazina de fibroblastos humanos previamente infectados com taquizoítas de <i>T. gondii</i> .....	58
4.3.	Efeito do extrato total de <i>A. annua</i> na infecção <i>in vivo</i> por <i>T. gondii</i> .....	62
4.3.1.	Análise da mortalidade e morbidade de camundongos infectados com a cepa RH de <i>T. gondii</i> .....	62
4.3.2	Análise da mortalidade e morbidade de camundongos infectados com a cepa ME49 de <i>T. gondii</i> .....	65
4.4	Detecção de <i>T. gondii</i> nos tecidos.....	67
4.5	Determinação da produção de citocinas e nitrito em sobrenadantes de macrófagos murinos após estimulação com diferentes concentrações de extrato total de <i>A. annua</i> .....	71
5.	DISCUSSÃO.....	73

5.1 Toxicidade e eficiência das drogas analisadas no controle da toxoplasmose <i>in vitro</i> .....	73
5.2 Avaliação do controle da toxoplasmose <i>in vivo</i> por extrato total de <i>A. annua</i> .....	76
5.3 Estimulação e secreção de citocinas e nitrito por macrófagos murinos na presença de extrato total de <i>A. annua</i> .....	78
6. CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS .....	82

## RESUMO

Considerando que o tratamento da toxoplasmose é baseado em drogas que apresentam uma limitada eficácia devido aos seus substanciais efeitos colaterais, a proposta do presente estudo foi avaliar os efeitos do extrato total de *Artemisia annua* *in vitro* e *in vivo*, na infecção por *Toxoplasma gondii*. O extrato total de *A. annua* foi preparado a partir de partes aéreas da erva seca, e testado em cultura celular ou em camundongos C57/BL6 que foram infectados com o parasito, em comparação ao tratamento com sulfadiazina, uma droga comercial existente. Considerando valores de citotoxicidade (DT50) e de inibição (DT50) para o pré-tratamento dos parasitos com *A. annua* foi determinado um índice terapêutico (IT). O extrato total de *A. annua* apresentou maior valor (IT= 544,5) quando comparado com a sulfadiazina (IT= 194,4). Quando o tratamento de fibroblastos humanos com as drogas foi realizado após a infecção com *T. gondii*, IT de ambas as drogas foram similares. Em experimentos *in vivo* utilizando cepa cistogênica do parasito foi demonstrado um eficiente controle da infecção pela utilização de extrato total de *A. annua*. Em conclusão, nossos resultados indicam uma potencial utilização do extrato total de *A. annua* no controle da infecção por *T. gondii* devido a sua baixa citotoxicidade e sua ação inibitória diretamente contra o parasito, resultando em uma ferramenta terapêutica bem tolerada.

Palavras chave: *Toxoplasma gondii*; *Artemisia annua* L; extrato total; efeito *in vitro*; efeito *in vivo*.

## ABSTRACT

Considering that the treatment toxoplasmosis are based on drugs that show limited efficacy due to their substantial side effects, the purpose of the present study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* effects of *Artemisia annua* crude extract on *Toxoplasma gondii* infection. *A. annua* was prepared from crude extract of dried herb and tested in cell cultures or C57/BL6 mice that were infected with the parasites by comparison with sulfadiazine, a commercially available drug. Considering cytotoxicity (TD<sub>50</sub>) and inhibition (TD<sub>50</sub>) values for pre-treatment of parasites, the therapeutic index (TI) was determined. The *A. annua* crude extract showed a higher value (TI = 544.5) as compared to sulfadiazine (TI = 194.4). When treatment of human fibroblasts with drugs was performed after *T. gondii* infection, TI of both drugs was similar. *In vivo* experiments with cystogenic parasite strain demonstrated that an effective control of infection by using *A. annua* crude extract. In conclusion, our results indicate a potential use of *A. annua* crude extract to control *T. gondii* infection, due to its low toxicity and its inhibitory action directly against the parasite, resulting in a well tolerated therapeutic tool.

*Keywords:* *Toxoplasma gondii*; *Artemisia annua* L.; Crude extract; *In vitro* effect; *In vivo* effect.

## 1. Introdução

### 1.1 *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* é um protozoário parasito intracelular obrigatório, pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Subordem Eimeriina, Família Sarcocystidae, Subfamília Toxoplasmatinae, Gênero *Toxoplasma* e Espécie *Toxoplasma gondii* (NEVES., 2002). O parasito foi primeiramente indentificado no Instituto Pasteur da Tunísia no ano de 1908, em células do baço e do fígado de um pequeno roedor norte-africano, *Ctenodactylus gondi* (NICOLLE; MANCEAUX, 1908). No mesmo ano, foi também isolado de coelhos mantidos no Instituto Biológico de São Paulo, Brasil (SPLENDORE, 1908). O primeiro relato de doença em humanos, entretanto, só foi descrito em 1923 por um oftalmologista que relatou a presença do parasito na retina de uma criança que apresentava hidrocefalia congênita (REMINGTON; KLEIN, 2001; SUKTHANA, 2006).

### 1.2 Características morfológicas e ultraestruturais

*T. gondii* assemelha-se às demais células eucarióticas, com a presença de um núcleo, mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e lisossomos. Assim como outros membros do filo Apicomplexa (*Plasmodium* e *Criptosporidium*) *T. gondii* apresenta forma de arco, com a extremidade anterior ou apical forma pontiaguda (conoidal) e na extremidade posterior forma arredondada (BLACK, BOOTHROYD, 2000). O revestimento do parasito é formado por uma película composta por três membranas, a membrana plasmática propriamente dita, externa e contínua, e um conjunto de duas membranas internas que possuem aberturas denominadas microporos, que podem estar envolvidas na passagem de nutrientes a partir da célula hospedeira. A extremidade anterior ou apical do parasito é caracterizada pela presença do complexo

apical, onde se localiza o conoide, dois anéis apicais, dois anéis polares e microtúbulos subpeliculares. Do anel polar 2, partem uma rede de citoesqueleto subpelicular, composto por 22 microtúbulos que se dispõem de maneira espiral sob o complexo da membrana interna e se estendem em sentido á região posterior do parasito. Além de manter a forma do parasito estas estruturas estão envolvidas com a motilidade e direcionamento de vesículas secretórias durante o mecanismo de invasão (Figura 1). (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998 ; BLACK; BOOTHROYD, 2000; HU et al, 2006).

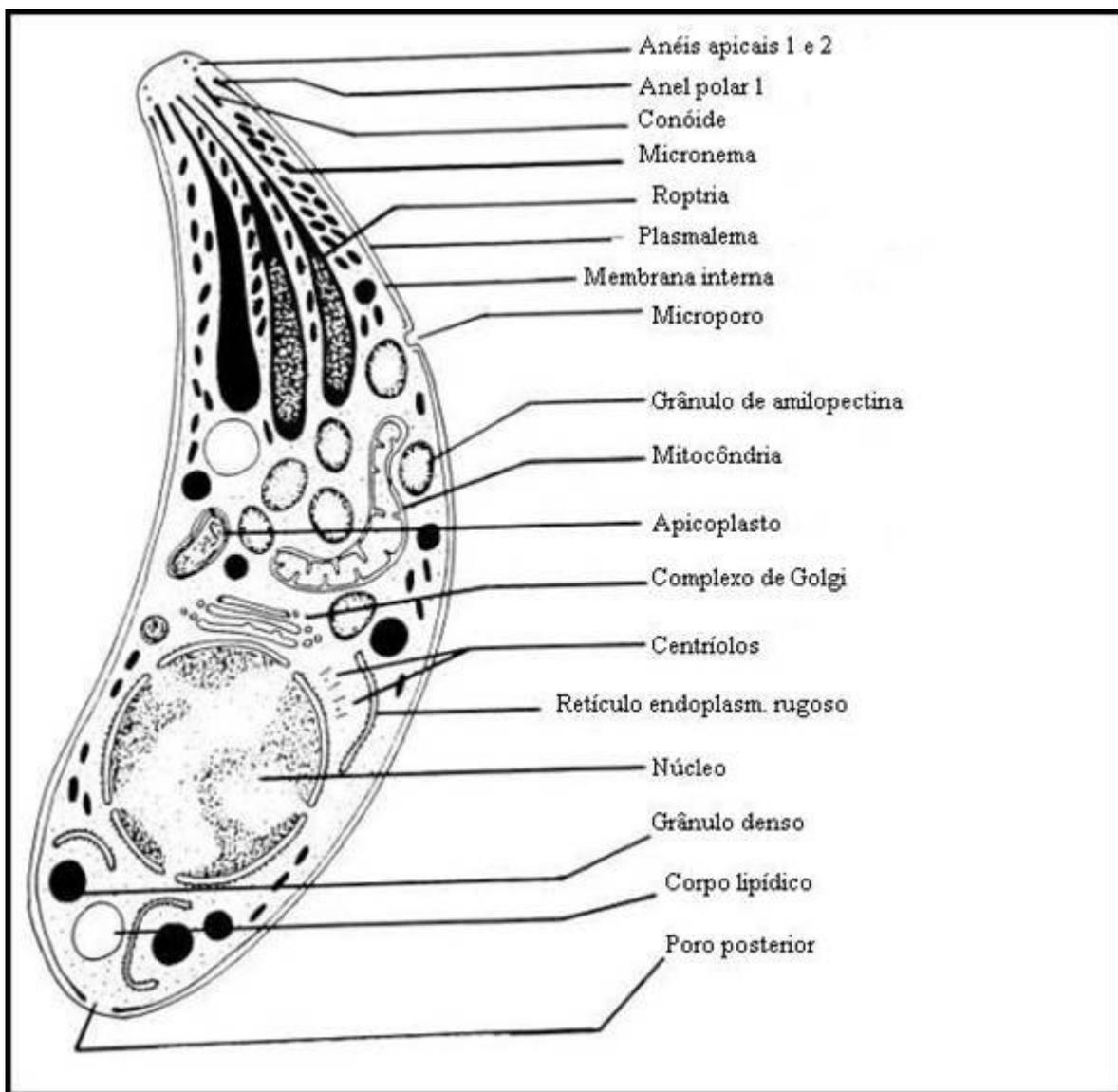
*T. gondii* possui também organelas secretórias, como micronemas, roptrias e grânulos densos que estão envolvidos nos processos de ataque, adesão e invasão do parasito nas células hospedeiras. Micronemas são organelas que aparecem concentradas ao longo da região anterior do parasito. Apresenta como conteúdo uma diversidade de moléculas adesivas importantes na adesão do parasito nas células (CARRUTHERS, 2002). Onze proteínas de micronemas já foram descritas (MIC1 a MIC11). MIC1 é uma lectina que se liga de modo específico a lactose presentes na superfície da célula hospedeira (LOURENÇO et al, 2001). MIC2 é uma proteína que participa diretamente do processo de adesão de *T. gondii* à célula hospedeira sendo capaz de se ligar a glicosaminoglicanas e moléculas de adesão como ICAM-1. Esse processo permite com que o parasito migre até sítios imunologicamente privilegiados como o cérebro e retina, utilizando-se de uma via paracelular. Esse componente é secretado apenas quando o parasito já está em contato com a célula hospedeira (BLACK; BOOTHROYD, 2000; BARRAGAM; BROSSIER; SIBLEY, 2005).

As roptrias, em número de 4 a 10 unidades, são encontradas na região anterior ao núcleo do parasito. Essas organelas estão intimamente relacionadas com o processo de invasão propriamente dito do parasito e estabilização do vacúolo parasitóforo dentro da célula hospedeira. Enzimas proteolíticas como ROP1 e PEF (fator de intensificação da

penetração) atuam na digestão de proteínas da membrana da célula hospedeira (BLACK; BOOTROYD, 2000).

Os grânulos densos, apesar de serem encontrados por todo o citoplasma, concentrando-se na extremidade anterior do parasito. Seu conteúdo protéico (GRA1 à GRA10) é liberado dentro do vacúolo parasitóforo, impedindo a ligação do lisossomo ao mesmo (CARRUTHERS, 2002).

O processo de invasão celular de *T. gondii* é rápido, levando cerca de 15 a 20 segundos, entretanto a ação sinérgica de um conjunto de fatores é fundamental para que esse processo se complete. O citoesqueleto do parasito é fundamental para a motilidade e polarização do mesmo na célula hospedeira. Stokkermans e colaboradores (1996) demonstraram que quando os microtúbulos subpeliculares são rompidos, a forma e a polaridade apical do parasito são perdidas. O processo de reconhecimento e adesão do parasito a célula hospedeira requer moléculas e receptores específicos, bem como a secreção de moléculas adesivas pelas micronemas. A invasão da célula alvo ocorre através da liberação de enzimas proteolíticas pelas roptrias e pelo contínuo movimento de rotação do parasito. Em seguida ocorre a formação do vacúolo parasitóforo, um mecanismo de defesa do parasito, que através da liberação de proteínas presentes nos grânulos densos, impede a fusão com lisossomos celular. Assim, a integridade do parasito fica garantida, possibilitando a multiplicação e permanência na célula hospedeira (BLACK, BOOTROYD, 2000).



**Figura 1 – Desenho esquemático de taquizoíta de *T. gondii* indicando suas principais organelas.**

**Fonte:** DUBEY; LINDSAY; SPEER (1998).

### 1.3 Linhagens Clonais de *T. gondii*

O genoma de *T. gondii* é haplóide, exceto durante a fase de reprodução sexuada que ocorre no interior das células intestinais de seus hospedeiros definitivos, contendo cerca de  $8 \times 10^7$  pares de nucleotídeos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). A maioria

dos isolados identificados na Europa e América do Norte pertence a um dos três genótipos, Tipo I, Tipo II ou Tipo III. A diferença genética entre essas linhagens clonais é de uma taxa de aproximadamente 1% de seus genes. Análises genéticas detalhadas evidenciam que a variação gênica dentro de cada genótipo de *T. gondii* é extremamente rara (BOOTHROYD; GRIGG, 2002). Entretanto, há um aumento no número de cepas descobertas que não pertencem a estes três genótipos. Essas cepas são denominadas recombinantes ou exóticas pelo fato de seus genótipos serem diferentes ou por representar uma mistura dos três genótipos existentes. Estudo recente demonstrou uma abundância de cepas recombinantes em pacientes com retinocoroidite no Brasil (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; PETERSEN, 2007). Atualmente, diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de investigar a correlação entre o genótipo de *T. gondii* e as manifestações da doença em humanos, verificando se há diferenças relacionadas à linhagem do parasito no que diz respeito à estimulação da resposta imune do hospedeiro e gravidade da doença (SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005).

Diferenças nos padrões de virulência e epidemiologia são observadas nas três linhagens clonais. Linhagens do tipo I, como a RH, são altamente virulentas para animais susceptíveis, linhagens do tipo II, como a ME49 são menos virulentas, podendo causar mortalidade dependendo da carga parasitária e da resposta imune do hospedeiro. As linhagens do tipo III são consideradas moderadamente virulentas. Em geral, as linhagens do tipo II são cistogênicas, enquanto as linhagens tipo I têm uma capacidade bem reduzida de formar cistos em cultura de células ou em animais infectados (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; KIM; WEISS, 2004; SAEIJ; BOYLE; SWITAJ et al., 2005). Em humanos, linhagens clonais do tipo II são mais comumente isoladas de infecções crônicas e congênitas na Europa, enquanto que linhagens isoladas de pacientes com toxoplasmose ocular na América do Sul são predominantemente do tipo I

e linhagens do tipo III são mais comumente isoladas de animais (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; PETERSEN, 2007). Esses resultados confirmam achados anteriores de estudos realizados em gatos (DUBEY et al., 2004; PENA et al., 2006) e galinhas caipiras da América do Sul (DUBEY et al., 2002; 2003 a,b,c; 2005a), que mostraram a predominância dos tipos I e III e ausência do tipo II, em contraste à grande predominância de linhagens do tipo II em animais nos países da América do Norte.

#### **1.4 Estágios Evolutivos e Ciclo Biológico**

Durante o ciclo biológico são encontrados três estágios evolutivos denominados taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas. Os taquizoítas medem de 4 a 8µm de comprimento e 2 a 4 µm de largura e apresentam núcleo na posição central. Podem invadir e multiplicar-se em qualquer célula nucleada, no interior de vacúolos parasitóforos onde sofrem rápida multiplicação, podendo conduzir a célula à morte (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Os bradizoítas apresentam estruturas semelhantes às formas taquizoítas, porém expressam proteínas de superfície diferentes. Essa forma caracteriza-se por apresentar núcleo situado próximo à extremidade posterior do parasito, inúmeros grânulos de amilopectina, número aumentado de micronemas e maior resistência à ação de enzimas proteolíticas. Essa forma caracteriza-se pela lenta multiplicação na célula hospedeira, levando a formação de cistos em diversos tecidos, principalmente em tecidos neurais e musculares (TOMAVO et al., 1991; COPPIN et al., 2003). O tamanho dos cistos é muito variável, dependendo do número de bradizoítas no seu interior, de sua forma e do tecido onde se encontram. Geralmente, apresentam em torno de 50-500 bradizoítas, apresenta parede fina e lisa em seu interior. Os bradizoítas podem persistir por toda a vida de seus hospedeiros, entretanto, podem ser liberados e se converterem novamente

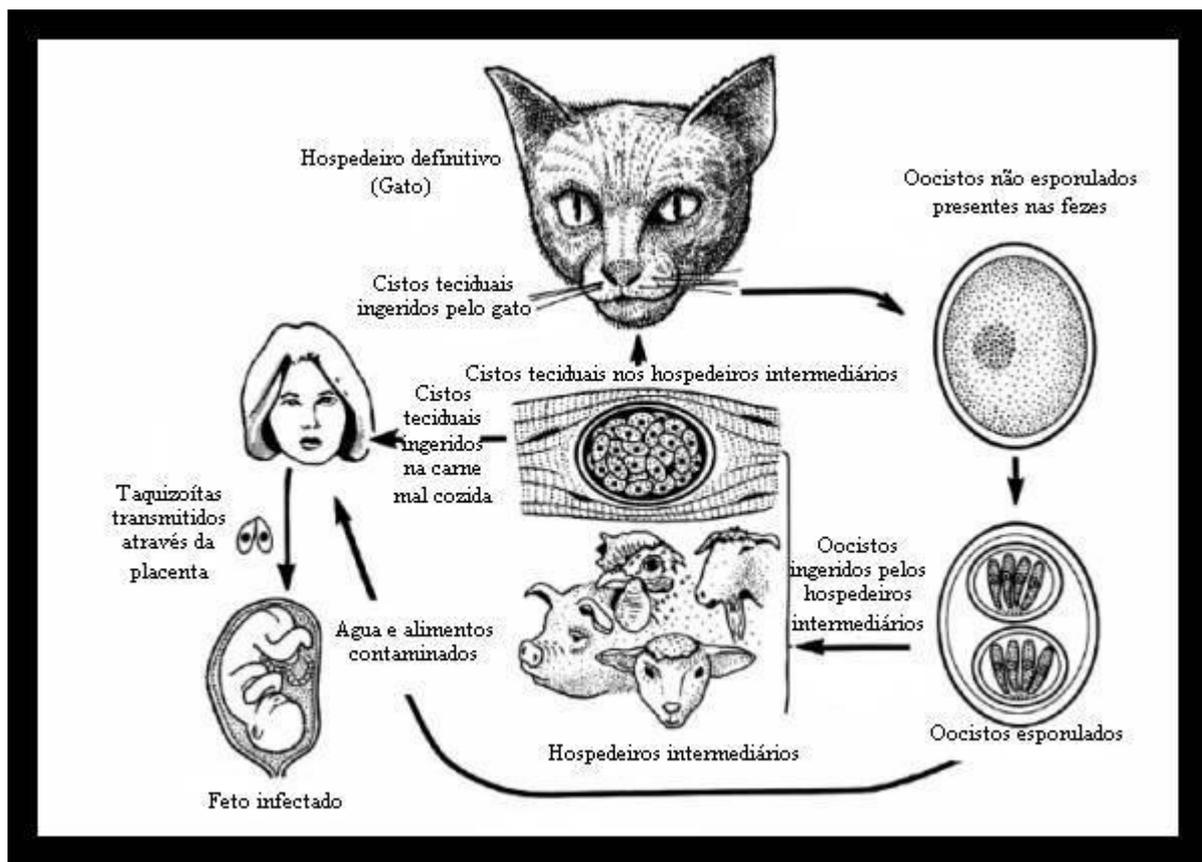
em taquizoítas em situações de imunossupressão do hospedeiro (DUBEY, 2004). No interior dos cistos, os bradizoítas se dividem por endodiogenia, tipo de reprodução assexuadas onde a célula filha é formada no interior da célula mãe, mantendo-se unida a ela pela região posterior (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

Os esporozoítas possuem micronemas, roptrias e grânulos de amilopectina mais abundantes que os taquizoítas e os bradizoítas e estão contidos em esporocistos no interior dos oocistos que são liberados juntamente com as fezes de felinos (hospedeiro definitivo). Os oocistos não esporulados de *T. gondii* apresentam dimensões aproximadas de 12 µm x 10 µm, com formato aproximadamente esférico. A esporulação ocorre no ambiente em torno de 1-5 dias após sua liberação nas fezes de felídeos infectados. Oocistos esporulados são sub esféricos, medindo aproximadamente 13 µm x 11 µm e contêm dois esporocistos cada um medindo 8 µm x 6 µm, e cada esporocisto contém quatro esporozoítas (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Apenas os gêneros *Felix* e *Lynx* são hospedeiros definitivos de *T. gondii*, ou seja, neles, o parasito se desenvolve por reprodução sexuada no epitélio intestinal. Durante a fase aguda, um gato com infecção primária pelo parasito libera milhões de oocistos por um período de até 28 dias (MONTROYA; LIESENFELD, 2004) e é possível se detectar oocistos nas fezes de felinos até um ano após infecção (REY, 2001).

*T. gondii* apresenta um ciclo biológico heteroxeno, (Figura 2) alternando entre fases de reprodução assexuada em seus hospedeiros intermediários e fases de reprodução sexuada em seus hospedeiros definitivos. Após a ingestão de cistos teciduais por felinos, a parede do cisto é digerida por enzimas proteolíticas do estômago e do intestino do hospedeiro ocasionando a liberação de bradizoítas que penetram nas células epiteliais da mucosa do estômago ou intestino delgado, multiplicando-se por esquizogonia, reprodução assexuada com divisão nuclear sem a concomitante divisão

citoplasmática, resultando na formação dos esquizontes e liberação dos merozoítas (DUBEY, 2004). Estes por sua vez, iniciam a formação de gametas, dando início à fase de reprodução sexuada por gamogonia, resultando na produção de oocistos não esporulados (imaturos), os quais são eliminados juntamente com as fezes dos felídeos. A esporulação do oocisto ocorre de 1 a 5 dias, dependendo das condições de aeração e temperatura do ambiente. Oocistos esporulados são a forma infectante e podem permanecer viáveis no solo por períodos indeterminados. Quando felinos ingerem oocistos, os esporozoítas são liberados, multiplicando-se assexuadamente nos tecidos. Alguns parasitos migram para o tecido intestinal, iniciando a fase sexuada da reprodução (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

Quando um hospedeiro intermediário ingere oocistos esporulados, ou cistos teciduais contendo bradizoítas, sua parede protetora é digerida pelas enzimas digestivas, resultando na liberação dos esporozoítas e bradizoítas respectivamente. Estes invadem o epitélio intestinal, e após alguns ciclos de reprodução rápida, são liberados diversos taquizoítas que invadem ativamente qualquer célula hospedeira, multiplicando-se rapidamente por endodigenia, gerando inúmeros taquizoítas, que rompem a célula hospedeira e são liberados nos tecidos, assim, eles invadem novas células, onde ocorrerá novo ciclo de reprodução. Taquizoítas disseminam-se pelo organismo, preferencialmente, para nas células do sistema nervoso central, olho, músculos esqueléticos e músculo cardíaco (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Nesta fase da infecção no hospedeiro intermediário (fase aguda), os taquizoítas estimulam uma forte resposta imune que limita a multiplicação dos taquizoítas, levando a conversão destes nas formas bradizoítas, que ficam confinadas no interior de cistos teciduais intracelulares, principalmente em tecidos neurais e tecidos musculares (LYONS; McLEOD; ROBERTS, 2002; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).



**Figura 2 – Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*.** Ciclo de vida apresentando as principais formas de transmissão do parasito para os hospedeiros definitivos e para os hospedeiros intermediários.

**Fonte:** DUBEY (2004).

### 1.5 Antígenos de superfície

A superfície do parasito *Toxoplasma gondii* é coberta por proteínas ancoradas à membrana via glicosilfosfatidilinositol (GPIs) (NAGEL; BOOTHROYD, 1989; TOMAVO; SCHWARZ; DUBREMETZ, 1989; TOMAVO; DUBREMETZ; SCHWARZ, 1992). Essas proteínas são estruturalmente relacionadas ao antígeno de superfície altamente imunogênico da família SAG1. Coletivamente, esses antígenos são conhecidos como superfamília de proteínas SRS (seqüências relacionadas a SAG1) (MANGER; HEHL; BOOTHROYD, 1998; JUNG; LEE; GRIGG, 2004). Compartilham identidade entre si, em aproximadamente 24-99% da seqüência de aminoácidos. A

seqüência de SAG1 apresenta uma configuração homodimérica, com dois monômeros entrelaçados entre si, formando um sulco carregado positivamente que é consistente com as propriedades de ataque mediado por SAG1, SAG2 e SAG3 (MINEO et al., 1993; DZIERSZINSKI et al., 2000; HE et al., 2002). Além do mais, trabalhos com SAG3 mostraram que esse antígeno é capaz de se ligar a proteoglicanas sulfatadas com alta afinidade (JACQUET et al., 2001). Esses dados sugerem que a superfamília SRS (SRS1, SRS2 e SRS3) pode apresentar receptores redundantes que facilitam a entrada do parasito em uma grande diversidade de células e hospedeiros (JUNG; LEE; GRIGG, 2004).

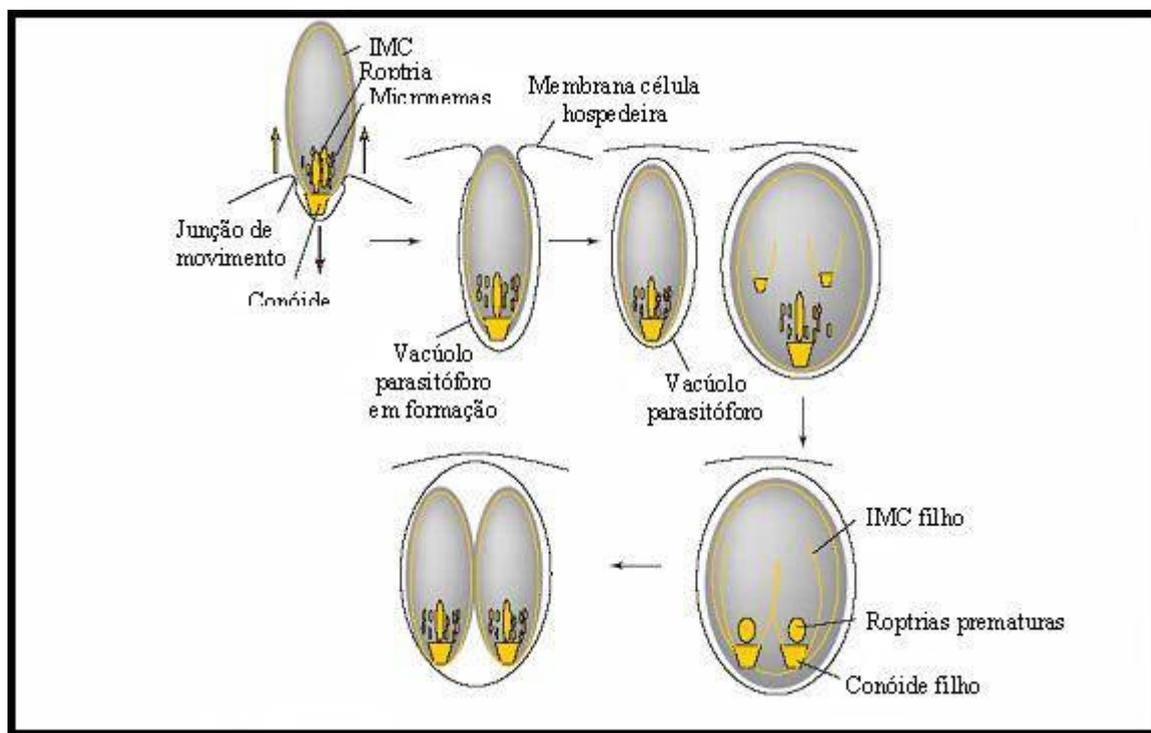
A expressão dessas proteínas é regulada de acordo com a fase do desenvolvimento biológico do parasito. SAG1 e SAG2A são expressas apenas nos taquizoítas, visto que SAG2C/D, BSR4 e SRS9 são encontradas apenas em bradizoítas (LEKUTIS; FERGUSON; BOOTHROYD, 2000; CLEARY et al., 2002). Durante a doença aguda SAG1 e SAG2A são altamente imunogênicos, induzindo uma forte resposta inflamatória (LEKUTIS; FERGUSON; BOOTHROYD, 2000). As proteínas da família SAG5 (SAG5A, SAG5B e SAG5C) apresentam similaridade estrutural com as proteínas da família SAG1. Análise das cepas RH (virulenta) e 76K (avirulenta) mostrou que todos os membros de SAG5 são transcritos em taquizoítas e bradizoítas de *T. gondii*. Entretanto, análises por *Immunoblotting* com a cepa RH revelaram que a síntese de SAG5A não ocorre em taquizoítas, possivelmente sendo controlado a nível pós-transcricional. Ao contrário, SAG5B e SAG5C foram detectados em lisados de taquizoítas, com um padrão de migração na faixa de 40-45 kDa sob condições redutoras e a 34 kDa sob condições não-redutoras (SPANNO et al., 2002). Alguns antígenos específicos à forma bradizoíta também têm sido identificados, tais como os antígenos

BAG e o antígeno MAG1, que é secretado pela matriz do cisto e é reconhecido por soros imunes do hospedeiro (PARMLEY; SGARLATO; REMINGTON, 1993).

### **1.6 Interação parasito-hospedeiro**

Após a infecção por via oral, *T. gondii* invade ativamente as células do epitélio intestinal, iniciando o processo de multiplicação (Figura 3). O processo de invasão da célula hospedeira é crucial para o sucesso da infecção e se assemelha muito a outros protozoários pertencentes também ao filo Apicomplexa. Esse evento, que acontece em menos de 10 segundos (MINEO et al., 1993; KASPER; MINEO, 1994) envolve a participação de receptores específicos presentes na superfície da célula hospedeira, bem como de proteínas liberadas por organelas secretórias do parasito. Desse modo, o processo de invasão inicia-se com a adesão do parasito à célula hospedeira. Para tal, antígenos imunodominantes do parasito, como a SAG1 se ligam a receptores na superfície da célula hospedeira, como a laminina, lectina e receptores de SAG1 (KASPER; MINEO, 1994). Ocorre então, uma mobilização do citoesqueleto do parasito e uma orientação de modo que a extremidade anterior se posiciona na célula para a protusão do conóide e invaginação da membrana plasmática para posterior formação do vacúolo parasitóforo. A entrada de *T. gondii* na célula hospedeira é um processo ativo, que envolve os motores de actina e miosina para penetração ativa por meio da rotação do parasito ao longo de seu eixo, oscilação e ondulação e proteínas excretadas pelas micronemas, que possuem função de adesão do parasito à célula (BLACK; BOOTHROYD, 2000). Uma vez no interior da célula, o parasito é protegido da degradação intracelular dentro do vacúolo parasitóforo. Em seguida, proteínas de roptrias são liberadas simultaneamente à formação desse vacúolo e então proteínas dos grânulos densos são secretadas e modificam a membrana do mesmo. Esse fato contribui

para a remodelação e formação de poros, o que permite o tráfego de componentes entre o vacúolo e o citoplasma da célula hospedeira, com a formação de uma rede intravacuolar metabolicamente ativa para a reprodução e desenvolvimento do parasito.



**Figura 3 – Invasão da célula hospedeira por *T. gondii***

**Fonte:** KEELEY; SOLDATI (2004).

### 1.7 Resposta Imune

A resposta imune à infecção por *T. gondii* é individual, complexa e compartimentada. A heterogeneidade de resposta imune pode ser explicada pela grande variabilidade genética. A capacidade de infectar uma grande diversidade de tecidos, como sistema nervoso e placenta permite a indução de respostas com aspectos inerentes à esses órgãos. O grau de complexidade se reflete na possibilidade de infecção recorrente com cepas do parasito com virulência variável (FILISETTI; CANDOLFI,

2004). Desse modo, a imunidade contra o parasito é uma incansável batalha, onde o corpo humano está sempre em busca de novas estratégias para eliminar o patógeno, evitando que este se instale e lhe cause maiores danos. Em contrapartida, o parasito utiliza todas as armas possíveis para evadir das defesas do hospedeiro e conseguir uma infecção efetiva e duradoura (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003)

### **1.7.1 Imunidade celular**

Sendo *T. gondii*, um parasito intracelular obrigatório, a principal resposta protetora contra o parasito é aquela mediada por células. Após a interação com antígenos parasitários, macrófagos atuam como células efetoras e apresentadoras de antígenos. Como efetoras, macrófagos inibem a replicação parasitária pela produção de intermediários reativos do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI), tais como óxido nítrico (NO), que bloqueiam o metabolismo do parasito, impedindo assim sua sobrevivência. Macrófagos ativados secretam altos níveis de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), que possui atividades microbicidas (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). Como células apresentadoras de antígenos, produzem altos níveis de interleucina-12 (IL-12) em resposta a alguns antígenos liberados por taquizoítas, essa interleucina estimula células NK a produzir e secretar altos níveis de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), o qual induz a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> na subpopulação Th1 produtora de IL-2 e IFN- $\gamma$ . Altos níveis de IFN- $\gamma$  estimulam macrófagos e células dendríticas a liberarem mais IL-12, amplificando assim a resposta imune. A IL-12 estimula também a produção IFN- $\gamma$  por linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Além disso, essas células apresentam atividade citotóxica, o que leva a lise de células infectadas com conseqüente liberação de taquizoítas. Esses por sua vez, ficam acessíveis a outros mecanismos da resposta imune, tais como anticorpos,

sistema complemento, macrófagos ativados e células NK (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; ALIBERTI, 2005).

A resposta imune pró-inflamatória, caracterizada por um perfil Th1, é efetiva no controle de taquizoítas, entretanto, ela pode ser danosa ao hospedeiro, devido principalmente a alta produção de IFN- $\gamma$  que lesiona os tecidos infectados. Desse modo, é necessária a ação de mecanismos imunomoduladores para o estabelecimento de um balanço entre um perfil de resposta Th1 e Th2. Esse balanço é mediado por IL-10, que é produzida por alguns tipos celulares em locais com alta carga parasitária. A IL-10 apresenta efeitos inibitórios sobre a produção de IFN- $\gamma$  por células NK e linfócitos T, sobre macrófagos ativados, sobre a diferenciação de clones Th1 de células T e sobre a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas. Estudos têm demonstrado que camundongos deficientes em IL-10 não conseguem controlar a infecção e morrem durante a fase aguda, devido a grande resposta inflamatória que ocorre principalmente no fígado e no intestino delgado, em virtude da produção descontrolada de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (GAZZINELLI et al., 1996).

A pressão da resposta imune do hospedeiro exercida sobre o parasito promove a formação de cistos nos tecidos. A imunidade nessa fase da doença é mediada pelos mesmos mecanismos acima citados.

Como forma de evasão da resposta imune, *T.gondii* exibe diversos mecanismos de escape, como a permanência dentro do vacúolo parasitóforo e a invasão de macrófagos, as principais células efetoras na destruição dos parasitos permitindo assim, o escape de processo microbicida efetuado por tais células. (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

### 1.7.2 Imunidade Humoral

A imunidade humoral é principalmente direcionada contra taquizoítas. Anticorpos específicos inibem a ligação do parasito a receptores celulares, impedindo assim sua invasão. Indivíduos com infecção crônica são usualmente resistentes à re-infecção por *T. gondii*, possivelmente devido à presença de imunoglobulinas circulantes, as quais podem ser produzidas tanto na circulação quanto nos tecidos infectados (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

Anticorpos IgM correspondem a primeira classe a ser produzida após infecção primária por *T. gondii* e não é encontrada nas reinfecções. No soro de humanos, anticorpos IgM aparecem 7 dias após infecção podendo ser detectada de 1 a 2 meses após a mesma. Entretanto, seus níveis séricos tendem a decair após 8 meses de infecção, como também pode persistir por tempo indeterminado. A presença de anticorpos IgM em recém nascidos é indicativo de infecção congênita uma vez que anticorpos IgM maternos são incapaz de ultrapassar a barreira placentária (PETERSEN, 2007; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003)

Anticorpos IgG representam a principal classe envolvida na resposta humoral contra *T. gondii*. Em seres humanos, anticorpos IgG específicos a antígenos de *T. gondii* aparecem após 1-2 semanas de infecção e seus níveis aumentam até atingir um pico em torno de 6-14 meses após a infecção, com uma ligeira queda após este período. Porém, níveis mais baixos de anticorpos IgG podem permanecer circulantes indefinidamente. Em infecções recentes, a avidéz de IgG por seus antígenos específicos é mais baixa e, à medida que a infecção avança, ocorre a maturação da resposta imune e estes anticorpos passam a apresentar avidéz crescente pelos seus antígenos. Deste modo, em infecções de maior duração, encontra-se um predomínio de anticorpos IgG de alta avidéz (CAMARGO et al., 1991). Resultados sorológicos isolados que mostram altos níveis de

anticorpos IgG de baixa avidéz não são suficientes para diagnosticar um infecção recente. Entretanto, altos níveis de IgG de alta avidéz podem excluir infecções primárias ou adquiridas recentemente (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

Durante a fase da infecção onde os parasitos se encontram em contato com a mucosa gastrointestinal ocorre a produção de anticorpos IgA por linfócitos que circulam pela lâmina própria. Esses linfócitos sensibilizados podem circular para outros locais, podendo produzir anticorpos IgA em outros sítios ativos de infecção, além da mucosa intestinal. Anticorpos IgA são produzidos apenas durante a fase aguda de uma infecção primária, não sendo observados durante a infecção crônica, constituindo, portanto, um bom marcador imunológico de infecção recente. Essa classe de anticorpo persiste circulante no sangue por cerca de 8-9 meses após a infecção. Níveis persistentes de anticorpos IgM na ausência de anticorpos IgA indica uma imunidade já estabelecida de uma infecção mais tardia, caracterizando um período de transição no perfil imunológico de resposta à infecção. Apesar de ser secretada no colostro, anticorpos IgA não atravessam a barreira placentária, mas podem ser detectados em recém-nascidos, quando a infecção congênita ocorre no terceiro trimestre de gestação. Se a infecção congênita ocorre no primeiro trimestre de gestação, esta imunoglobulina está ausente no sangue do recém-nascido (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

## **1.8 Transmissão**

Quanto aos processos de infecção, o homem pode se infectar com *T. gondii*, por seis diferentes maneiras: (1) Ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos esporulados excretados por felídeos infectados. (2) Ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais, principalmente as carnes de suínos, ovinos e caprinos; (3) Transmissão vertical ou congênita, por meio da passagem de taquizoítas da mãe para o

feto através da placenta, principalmente na fase aguda da infecção; (4) Transplante de órgãos de um doador infectado para um receptor soronegativo; (5) Transfusão sanguínea de doadores infectados para receptores soronegativos; (6) Acidentes laboratoriais ou entre profissionais de saúde com objetos contaminados com taquizoítas viáveis, ou acidentes envolvendo animais infectados (DUBAY, 2004, TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

## **1.9 A toxoplasmose**

Toxoplasmose é uma doença causada pelo protozoário *T. gondii*. Representa uma das mais comuns zoonoses parasitárias acometendo cerca de um terço da população mundial (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). A doença é geralmente assintomática em indivíduos imunocompetentes, entretanto, em dois grupos especiais, os indivíduos imunocomprometidos e gestantes a toxoplasmose pode se configurar como um problema grave (LUFT; REMINGTON, 1992; REMINGTON et al., 1995). Os principais fatores que interferem na patogênese de *T. gondii* são a carga parasitária do inóculo, a virulência da linhagem do parasito, o genótipo do hospedeiro, bem como o seu sexo e o seu estado imunológico (DUBEY, 2004).

### **1.9.1 Indivíduos Imunocompetentes**

Em pacientes imunocompetentes a toxoplasmose é geralmente assintomática. A infecção é geralmente auto-limitada pelo desenvolvimento da resposta imune celular protetora. A manifestação clínica mais típica neste grupo de pacientes é a linfadenopatia cervical, na qual os linfonodos podem permanecer aumentados. Em casos muito raros, já foram relatadas miocardite, polimiosite, pneumonia, hepatite ou encefalite (REMINGTON et al., 2001; REY, 2001).

### **1.9.2 Toxoplasmose ocular**

A toxoplasmose ocular representa uma das formas clínicas mais comuns entre pacientes infectados. O parasito possui tropismo por certos órgãos como tecido cerebral, placenta e olho. Nos olhos, o parasito infecta células da retina, provocando coriorretinite toxoplásmica que pode ser resultante de infecção aguda, congênita ou reativação de uma infecção crônica. Os principais sinais de uma coriorretinite toxoplásmica são lesões focais brancas visíveis, com uma intensa reação inflamatória associada (MONTROYA; REMINGTON, 1996; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

### **1.9.3 Indivíduos Imunocomprometidos**

Em pacientes imunocomprometidos uma infecção latente adquirida previamente pode sofrer reativação, causando principalmente encefalite toxoplásmica e toxoplasmose disseminada (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Atualmente a toxoplasmose tem sido reconhecida como uma das mais comuns infecções oportunistas em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Infecção ocular nesses pacientes pode ser resultado de uma reativação de doença congênita ou de disseminação do parasito adquirido anteriormante. As manifestações clínicas mais comuns são: confusão mental, déficits motores focais, distúrbios dos nervos cranianos, anormalidades sensoriais, sinais cerebelares, desordens dos movimentos e sinais neuropsiquiátricos. (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

#### **1.9.4 Toxoplasmose congênita**

A passagem transplacentária de formas taquizoítas em gestantes primoinfectadas é o fator que permite o desenvolvimento da toxoplasmose congênita, uma vez que os mesmos podem atingir os tecidos fetais. A gravidade da doença depende do estágio da gravidez e do tempo de infecção da mãe (DUBEY, 2004). A infecção congênita geralmente ocorre durante a fase aguda da infecção materna, dessa maneira, quando adquirida antes da gestação normalmente exclui o risco de transmissão para o feto (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005). Entretanto, estudos relatam a ocorrência de transmissão congênita em gestantes infectadas poucas semanas antes da gestação (CHEMLA, et al, 2002,). Quando a infecção materna ocorre no primeiro trimestre da gestação, a taxa de transmissão parasitária materno-fetal é pequena, cerca de 2%, entretanto, o comprometimento fetal é aumentado. Por outro lado, quanto mais tardia for a infecção materna durante a gestação, maior a taxa de transmissão para o feto, cerca de 90% (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). As conseqüências para o feto são, de modo geral, morte fetal intra-uterina, nascimento de crianças com hidrocefalia, microcefalia, calcificações intracranianas, coriorretinite, estrabismo, cegueira, epilepsia, retardamento mental e motor, trombocitopenia e/ou anemia. Os recém-nascidos infectados congenitamente, podem apresentar-se assintomáticos ao nascimento, porém estes indivíduos virão a apresentar quadros de retinocoroidite em algum momento de sua vida, decorrente da infecção. (REMINGTON; McLEOD; DESMONTS 1995; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005).

## **1.10 Diagnóstico**

Vários métodos de tem sido desenvolvidos com o objetivo de se obter um diagnóstico mais preciso da infecção, bem como a determinação da fase da infecção que o indivíduo apresenta. Tais métodos são baseados na detecção do parasito ou de algumas de suas moléculas específicas (métodos diretos) ou na detecção de anticorpos específicos a antígenos do parasito presentes no soro de indivíduos infectados (métodos indiretos ou sorológicos). Existem quatro grupos de indivíduos onde o diagnóstico da toxoplasmose é crítico: mulheres grávidas que adquiriam a infecção durante a gestação, fetos e recém-nascidos infectados congenitamente, pacientes imunocomprometidos e pacientes com coriorretinite (REMINGTON et al., 2004). Um dos maiores desafios no diagnóstico para toxoplasmose é determinar se a gestante adquiriu o parasito durante a gestação ou anteriormente à mesma, uma vez que uma infecção crônica na mãe não causa riscos à saúde do feto ou do recém-nascido (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005).

### **1.10.1 Métodos diretos**

Estes métodos baseiam-se na demonstração direta do parasito em amostras biológicas, tais como sangue, líquido, saliva, humor aquoso e fragmentos de órgãos colhidos por biópsia, através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) ou por imunohistoquímica (IHC). Além destas, há o isolamento dos parasitos após inoculação de materiais biológicos em animais de laboratório (bioensaio). A reação de PCR tem sido preferencialmente empregada no diagnóstico da toxoplasmose congênita, ocular e em pacientes imunocomprometidos através da detecção de seqüências específicas do genoma de *T. gondii* em amostras de pacientes (REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004). A sensibilidade e a especificidade dessa reação são geralmente altas, mas dependem de vários fatores, tais como, a destruição do parasito

durante o processamento ou coleta da amostra pós-terapia, que podem contribuir para a baixa sensibilidade do teste (SWITAJ et al., 2005). A reação de PCR não permite estabelecer em que fase da doença o paciente se encontra, uma vez que há detecção do DNA do parasito. Um resultado positivo obtido a partir dessa técnica em amostra de tecido cerebral, por exemplo, não diferencia entre um paciente com encefalite toxoplásmica ou um indivíduo com outra patologia cerebral, mas que apresenta infecção crônica por *T. gondii*, com cistos teciduais. Somente o isolamento do parasito a partir de fluidos corporais pode comprovar que se trata de infecção aguda (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

A técnica de imunohistoquímica é comumente utilizada para demonstrar o parasito em tecidos ou esfregaços de fluidos corporais (líquor e lavado broncoalveolar). Taquizoítas podem ser detectados tanto em infecção primária (aguda) como em casos de reativação de infecção crônica (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Técnicas de isolamento de parasito em materiais biológicos são menos sensíveis uma vez que necessitam de parasitos viáveis para sua realização. Bioensaios geralmente utilizam camundongos, os quais são inoculados com amostras de diferentes materiais biológicos extraídos de pacientes com suspeita de infecção. Após a inoculação faz-se a observação da conversão sorológica do animal e a pesquisa quanto a presença de parasitos em tecidos do animal (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

### **1.10.2 Métodos indiretos**

O diagnóstico sorológico da toxoplasmose é baseado na detecção de anticorpos ou antígenos presentes em fluidos biológicos, especialmente no soro.

O teste do corante de Sabin-Feldman (SFDT – Sabin-Feldman dye test) foi o primeiro a ser utilizado como referência para sorologia de *T. gondii* (SABIN;

FELDMAN, 1948). Ele apresenta boa reprodutibilidade e alta sensibilidade, porém a necessidade de parasitos vivos e de soro normal fresco (presença de frações do sistema complemento) para que ocorra a lise do parasito, dificulta sua ampla realização. Entretanto, este teste é ainda utilizado em inquéritos soropidemiológicos em diversas espécies animais, inclusive silvestres, pois não necessita de anticorpos secundários ou conjugados imunoenzimáticos espécie-específicos (CAMARGO, 1964). Ainda hoje, este teste é considerado como um método sorológico padrão para o diagnóstico da toxoplasmose (SUKTHANA, 2006).

O teste de imunofluorescência indireta (indirect fluorescent antibody test – IFAT) é amplamente utilizado para o diagnóstico da toxoplasmose em animais e humanos (CAMARGO, 1964). O antígeno utilizado nesta técnica é constituído por taquizoítas intactos, formolizados e fixados em lâminas de vidro para microscopia, que revelam uma fluorescência periférica e brilhante após incubação com amostras de soro e anticorpos secundários espécie-específicos marcados com fluorocromos (conjugados fluorescentes). Fluorescência somente na extremidade apical (coloração polar) é considerada como reação não específica, devido a reações cruzadas com outros parasitos do grupo Apicomplexa. IFAT apresenta alta especificidade, pois apresenta baixa reatividade cruzada com outros parasitos. Entretanto, a necessidade de um microscópio de fluorescência, técnicos treinados e experientes, resultados relativamente subjetivos, e maiores dificuldades de utilização em grandes inquéritos soropidemiológicos, são algumas desvantagens apresentadas por este método (CAMARGO, 1964).

O método sorológico mais utilizado no diagnóstico da toxoplasmose é o ensaio denominado ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Anticorpos IgM podem ser encontrados na primeira semana após a infecção, seus níveis tendem a aumentar por um

certo período e então declinam e desaparecem. A detecção de anticorpos IgM caracteriza a fase aguda da doença. Entretanto, o número de resultados falso-positivos é grande e, além disso, esse anticorpo pode persistir por anos em alguns indivíduos, levando a uma incorreta interpretação do quadro clínico (REMINGTON et al., 2004). Anticorpos IgA também são característicos de fase aguda e a pesquisa de IgA, associadas a IgM é utilizada para se caracterizar infecção recente. A detecção de IgA específica no soro pode ser usada para a confirmação de resultados, uma vez que geralmente é detectada em níveis mais elevados durante uma infecção recente, desaparecendo completamente antes da IgM, porém apresenta níveis muito variáveis. O teste ELISA de captura para IgA é mais específico e mais sensível que o teste ELISA indireto, mas um resultado positivo nem sempre significa infecção recente, enquanto um resultado negativo nem sempre pode excluir uma infecção aguda. Quando se tem suspeita de toxoplasmose congênita e há uma ausência de IgM/IgA com presença de IgG, se deve realizar o teste de *immunoblotting* tanto da mãe quanto da criança (MONTAIA; LISENFELD, 2004). A detecção dos níveis de imunoglobulina G (IgG) não auxilia no diagnóstico da toxoplasmose, uma vez que este anticorpo aparece cerca de 2 semanas após a infecção e persiste por toda a vida do indivíduo, não permitindo desse modo diferenciar uma infecção aguda de uma exposição pregressa (MONTAIA; LISENFELD, 2004). O teste de avididade de IgG foi desenvolvido para ajudar a discriminar entre uma infecção recente e uma infecção tardia, uma vez que IgG de baixa avididade é indicativo de infecção recente, enquanto que IgG de alta avididade indica que a infecção ocorreu há mais de 3 meses. Entretanto, IgG de baixa avididade pode persistir por anos, inviabilizando o diagnóstico da toxoplasmose. O teste é utilizado principalmente em gestantes que apresentam IgG e IgM positivo, recentemente, também tem sido utilizado para

diagnosticar linfadenopatia toxoplásmica em pacientes imunocompetentes (MONTROYA; LISENFELD, 2004).

A detecção de anticorpos IgE tem sido proposta para a diferenciação do estágio da infecção, uma vez que são detectados apenas durante a infecção aguda e a duração de sua soropositividade é menor que a de IgM e IgA. Porém, a demonstração de que pode ser detectada em casos de reativação de infecção crônica e a falta de testes padronizados para sua detecção torna sua pesquisa pouco utilizada no diagnóstico da toxoplasmose (FOUDRINIER et al., 2003; SENSINI, 2006).

Segundo Camargo et al. (1978) a toxoplasmose pode ser caracterizada em três perfis sorológicos:

**Perfil I:** Presença de anticorpos IgM e IgA, com uma rápida ascensão de anticorpos IgG de baixa avidéz.

**Perfil II:** Fase sorológica de transição, onde anticorpos IgG são detectados em altos títulos. Os anticorpos IgM são encontrados em baixos títulos, tendendo a desaparecer e há ausência de anticorpos IgA.

**Perfil III:** Anticorpos IgG de alta avidéz estão presentes em baixos títulos e anticorpos IgM e IgA estão ausentes.

Na técnica de *immunoblotting*, antígenos totais de *T. gondii*, são separados de acordo com a massa molecular em gel de poliacrilamida, por meio de eletroforese e imobilizados em membranas de nitrocelulose, são incubados com amostras de soro e com conjugados imunoenzimáticos espécie-específicos. Antígenos específicos estão sendo pesquisados a fim de se encontrar marcadores que distingam entre fase aguda e crônica da doença.

### 1.11 Epidemiologia

Estima-se que cerca de um terço da população mundial esteja infectada por *T. gondii*, configurando-se assim a toxoplasmose uma das zoonoses mais comuns no mundo (DUBEY, 2004). Entretanto, a soroprevalência varia enormemente entre diferentes países, entre diferentes áreas geográficas do mesmo país e entre diferentes grupos étnicos vivendo na mesma área. Assim sendo, anticorpos anti-*T. gondii* podem ser encontrados numa taxa que varia de 0-100% da população, dependendo do grupo analisado (TENTER; HECKEROTH, WEISS, 2000). Uma dificuldade em se estabelecer a taxa de prevalência real da infecção em diferentes regiões reside na grande diversidade de métodos utilizados nos inquéritos, os quais podem variar muito em sensibilidade e especificidade. Na década de 1990 a soroprevalência em países da Europa Central era em torno de 50% da população, enquanto que em países como Brasil, Cuba e Alemanha, essa taxa chegou a 70% (TENTER; HECKEROTH, WEISS, 2000; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Algumas recomendações devem ser levadas em consideração para a prevenção da toxoplasmose. Devem ser evitados alimentos preparados com carnes cruas ou mal cozidas evitando-se assim a contaminação por cistos teciduais, deve-se lavar as mãos e os utensílios utilizados no preparo de carnes. Alimentos que são ingeridos crus, tais como frutas e verduras, devem ser bem lavados para evitar a contaminação com oocistos, a água ingerida deve ser tratada e filtrada, uma vez que alguns surtos de toxoplasmose têm sido atribuídos à contaminação de fontes de água. Contato com gatos ou suas excreções deve ser evitado, principalmente por mulheres grávidas, bem como o acesso destes animais a reservatórios de água ou plantações de hortaliças. Além disso, devem ser usadas luvas durante procedimentos de jardinagem, tendo-se o cuidado de lavar as mãos após contato com solo ou com animais, que podem ter oocistos presos aos

pêlos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; HILL; DUBEY, 2002; DUBEY, 2004; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005; SUKTHANA, 2006).

No caso de gestantes, elas devem fazer um exame pré-natal e, caso sejam soronegativas para toxoplasmose, devem intensificar as medidas de prevenção a fim de não se infectarem durante a gestação. Entretanto, caso a infecção ocorra, devem receber tratamento adequado (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; KRAVETZ; FEDERMAN, 2005).

O desenvolvimento de uma vacina que seja eficiente contra a infecção tem sido alvo de intensas investigações. Atualmente apenas uma vacina tem sido utilizada comercialmente para a imunização de ovelhas (BUXTON; INNES, 1995). Entretanto, recentes progressos no conhecimento sobre a resposta imune protetora contra *T. gondii* e mecanismos de evasão do parasito têm contribuído muito para as pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novas vacinas. Vários componentes parasitários como SAG1, SAG2, GRA4 e ROP2 têm sido alvos de estudos por apresentarem capacidade de induzir forte imunidade celular e humoral que conferem proteção duradoura contra a infecção (BHOPALE, 2003).

### **1.12 Tratamento**

A função da terapia em suprimir a infecção ativa é de grande importância visto a ampla distribuição do parasito. Segundo Hegab e colaboradores (2003), um grande e variado número de drogas são indicadas para o tratamento, porém nenhuma é capaz de erradicar completamente a infecção. As drogas utilizadas no controle da toxoplasmose podem ser agrupadas nas seguintes categorias:

**Antagonistas de Folato:** Essas drogas inibem a síntese de enzimas que participam da via da síntese de folato, impedindo a duplicação do DNA celular, em estágio agudo da infecção. Nesse grupo estão incluídas as drogas, pirimetamina, trimetopim e

sulfadiazina, que possuem efeito sinérgico. O uso combinado de pirimetamina e sulfadiazina tem sido aprovado como tratamento de escolha para a toxoplasmose desde 1950. Seu uso combinado é oitenta vezes mais efetivo que a utilização das drogas sozinhas. Entretanto, a sulfadiazina não é bem tolerada pelo organismo, apresentando efeitos adversos, principalmente supressão de medula óssea (PETERSEN, 2007). Além do que, é necessária a concomitante administração de ácido fólico, principalmente em pacientes grávidas, e a administração dessa droga em pacientes imunocomprometidos é motivo de controvérsias (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; MARTINS-DUARTE, 2006).

Macrolídeos apresentam efeito tóxico ao parasito através da ligação a açúcares. Os macrolídeos mais comuns utilizados contra a toxoplasmose são espiramicina, clindamicina e azitromicina (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). Espiramicina possui atividade toxoplásmica intracelular e capacidade de atravessar a barreira placentária, portanto ela é principalmente utilizada durante a gestação. Entretanto ela não é indicada para o tratamento de toxoplasmose ocular, sendo a clindamicina tratamento de escolha para esse caso. A clindamicina é utilizada combinada à pirimetamina em pacientes que são sensíveis a sulfadiazina (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Hidroxi-naftoquinonas são drogas muito usadas no controle de parasitos do gênero *Plasmodium* e os efeitos tóxicos ao parasito são devido à inibição do citocromo bc1 que é um receptor de elétrons de diversas vias metabólicas e doa esses elétrons para o citocromo c (inibem a cadeia respiratória do parasito). A principal droga pertencente a essa classe é a Atovaquone, que é uma hidroxynaphthoquinone. Estudos em camundongos indicam que essa droga pode ter efeito sobre cistos teciduais (FERREIRA et al, 2006; PETERSEN, 2007), representando assim, um alvo potencial em estudos que visam a redução da recorrência da doença. Dessa forma pode ser utilizada no tratamento

de pacientes imunossuprimidos cronicamente infectados (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

Fluoroquinolonas impedem a proliferação do parasito devido à inibição de enzimas envolvidas na replicação do DNA. Gatifloxacina e travafloxacina são duas fluoroquinolonas que mostram efeitos no tratamento experimental contra *T. gondii*. O uso combinado de gatifloxacina e pirimetramina tem mostrado bons resultados em experimentos utilizando camundongos infectados (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003).

Corticosteróides são drogas que inibem a resposta imune do hospedeiro, podendo assim diminuir uma alta resposta inflamatória gerada pelo parasito, porém, o uso de corticosteróides deve ser utilizado com cautela.

A administração destas deve ser feita levando-se em consideração o estágio da infecção e o grupo ao qual o paciente pertence; gestante, indivíduo imunocompetente, indivíduo imunocomprometido ou recém-nascido (MONTOYA, LIESENFELD, 2004). Em infecção primária de gestantes, o tratamento de escolha é iniciado com a administração de espiramicina e posteriormente a associação de pirimetamina e sulfadiazina, com administração concomitante de ácido folínico. Associação de pirimetamina e sulfadiazina é indicada para pacientes imunocomprometidos (PETERSEN, 2007). Em pacientes imunocompetentes não é recomendado tratamento. Um grande número de novas drogas e associação de drogas já existentes estão sendo pesquisadas para o tratamento da toxoplasmose, dentre elas, artemisinina, uma droga comumente utilizado no tratamento de malária tem sido alvo de estudos quanto a utilização no tratamento da toxoplasmose (SARCIRON et al., 2001; DJURKOVIM-DJAKOVIM, et al, 2002; DUNAY, 2004; FERREIRA et al, 2006; JONES-BRANDO et al, 2006).

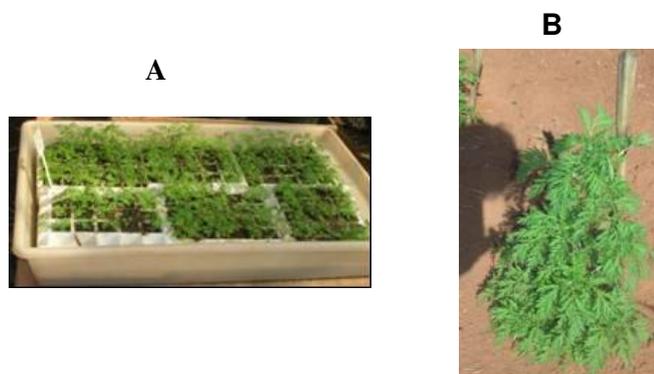
### 1.13 *Artemisia annua* L.

*Artemisia annua* é uma erva de ciclo anual de cerca de 1,80m de altura, comumente encontrada em regiões de vegetação de estepes na China (Figura 4) (HEEMSKERK; SCHALLIG; PITERS, 2006). Taxonomicamente pertence à família Asteraceae, cujas inúmeras plantas são utilizadas na medicina popular como a *Artemisia vulgaris* L. e *Calendula officinalis* utilizadas no controle de verminoses e *Achillea millefolium* L utilizada em problemas estomacais (LANS et al., 2007). Atualmente, pode ser encontrada em outros países como a Austrália, Argentina, França, Bulgária, Hungria, Itália e USA. *Artemisia* é utilizada como fonte de óleos naturais e componentes aromáticos de grande interesse na indústria de cosméticos, e como fonte de artemisinina, uma potente droga antimalárica (DHINGRA; RAO; NARASU, 1999). Essa erva tem sido utilizada no tratamento contra febre e malária na China há cerca de 150 a.c, entretanto, somente após a descoberta do metabólito ativo, artemisinina em 1972, pesquisas sobre seu efeito aumentaram rapidamente. Devido à importância concedida à planta após a descoberta da artemisinina, folhas de *A. annua* foram intensamente coletadas o que levou a quase extinção da planta em determinadas regiões (HEEMSKERK; SCHALLIG; PITERS, 2006). Em resposta a essa grande demanda, *A. annua* já tem sido cultivada na China e no Vietnã desde a década de 1970 e em meados da década de 1990, *A. annua* passou a ser cultivada na África e em outras partes do mundo. Na Romênia e Bulgária ela é cultivada para a obtenção de óleo essencial, já nos USA é cultivada em pequenas proporções para obtenção de material aromático (JANICK, 1995). Em 2004 a China anunciou o plantio de 2000ha de *A. annua*. O cultivo da erva, entretanto, requer alguns cuidados. As sementes devem ser postas para germinar em uma estufa muito bem gerenciada, plântulas são delicadas e devem ser plantadas com cuidado em local bem preparado, com uma densidade de 3 a 4 plantas

por m<sup>2</sup>. A irrigação deve ser realizada se houver risco de escassez de água, especialmente quatro semanas após ser transferida para o campo. A colheita é geralmente realizada manualmente, antes do período de floração para obtenção de maiores quantidades de artemisinina. O material coletado deve ser rapidamente secado, triturado e estocado protegido de umidade para que se evite a deterioração da artemisinina (HEEMSKERK; SCHALLIG; PITERS, 2006).

A produção sintética de artemisinina é muito trabalhosa e requer um alto custo, desse modo, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de aumentar a produção de artemisinina pela *A. annua*. No Brasil a pesquisa foi iniciada somente após 1980, por meio da iniciativa de um grupo de cientistas da Universidade Estadual de Campinas que importou a planta. O trabalho culminou no isolamento da artemisinina. O híbrido foi desenvolvido para florescimento tardio e maiores teores de artemisinina, possuindo um significativo ganho no teor de artemisinina (0.02% para 1.4%). Bilia e colaboradores (2006) demonstraram que um cultivar produzido no Brasil possui altas concentrações de artemisinina e flavonóides em relação a um cultivar comercial Chines.

Apesar da grande atenção dada a artemisinina, esse composto não é o único metabólito ativo presente em extratos de *A. annua*. O mesmo possui inúmeros metabólitos secundários como sesquiterpenos, flavanóides, cumarinas, esteróides e compostos alifáticos. A combinação destes constituintes é responsável pelas atividades antibacterianas, antiinflamatórias e antitumorais do extrato (BHAKUNI et al, 2001).

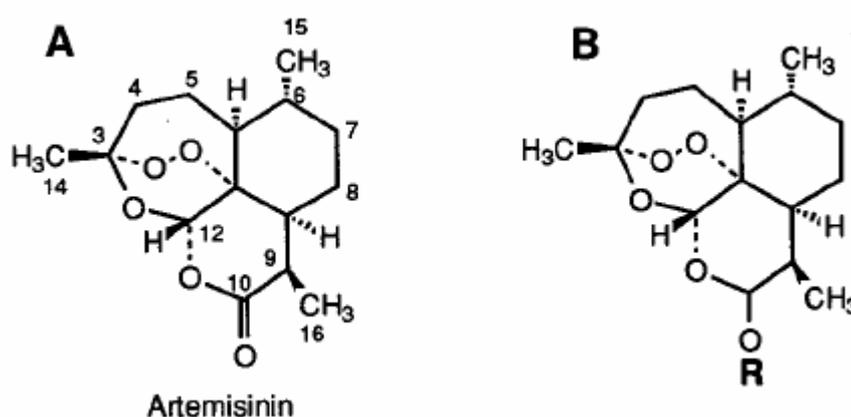


**Fig 4. Foto da planta *Artemisia annua*.** (A) Plântulas cultivadas em casa de vegetação, (B) Planta com cerca de 60cm de altura, cultivada em área experimental na UFU.

#### 1.14 Artemisinina

Artemisinina ou quinghaosu é um composto ativo presente em extratos de *A. annua*. Quimicamente, é um lactona sesquiterpênica e sua estrutura inclui a presença de um endoperoxidase (C-O-O-C) que é único entre as drogas anti-malária (Figura 5) (MESHNICK, TAYLOR, KAMCHONWONGPAISAN, 1996). Dihidroartemisina é derivado da artemisinina pela redução do grupo lactona. Vários derivados têm sido produzidos sinteticamente objetivando uma melhor absorção, maior meia vida e ação efetiva, além da possibilidade de produção em larga escala. Essa classe de drogas tem apresentado muitas vantagens no tratamento da malária por não apresentar parasitos resistentes a ela e pela rápida eliminação do parasito do sangue periférico. Estudos recentes têm demonstrado a utilização de artemisinina e seus derivados semi-sintéticos no controle de alguns trematódeos tais como *Fasciola hepatica*, *Schistosoma* sp, *Clonorchis sinensis* e *Opisthorchis viverrini* (KEISER et al, 2007a,b; KEISER; MORSON, 2007; UTZINGER et al, 2007; XIAO et al, 2007; KEISER et al, 2006). Entretanto, artemisinina e seus derivados possuem meia vida curta, sendo que níveis

efetivos da droga no plasma são sustentados por um curto período de tempo. Dessa forma a utilização desses compostos sozinhos são associados a recrudescência da infecção (MESHNICK, TAYLOR, KAMCHONWONGPAISAN, 1996). Artemisinina e seus derivados semi-sintéticos sofrem rápida absorção gastro-intestinal e são primeiramente metabolizados no fígado, tendo picos plasmáticos em torno de 1h. Esses compostos são então rapidamente hidrolisados a dihidroartemisinina e eliminados rapidamente do plasma com uma meia vida variando de 45 min a 11 horas (DHINGRA; RAO; NARASU, 1999).



**Figura 5.** Representação química da artemisinina (A) e derivados (B) incluindo a dihidroartemisinina (R= H), artemether (R= CH<sub>3</sub>), arteether (R= CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), e artesunato [R= OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Na].

**Fonte:** MESHNICK, TAYLOR, KAMCHONWONGPAISAN, 1996.

### 1.15 Mecanismo de ação em *Plasmodium* sp e toxicidade

Artemisinina e seus derivados atuam de forma estágio específico, agindo efetivamente sob trofozoítas e gametócitos. A droga causa mudanças estruturais nos estágios enterocíticos do parasito, pois afetam a estrutura das membranas biológicas, levando a formação de vacúolo autofágico e perda de citoplasma o que leva o parasito à

morte (DHINGRA; RAO; NARASU, 1999). A função da endoperoxidase é vital para sua atividade antimalárica. Tem sido relatado que a morte dos parasitos por artemisinina e seus derivados é acompanhada pela produção de compostos tóxicos como radicais livres e aldeídos. Seu mecanismo de ação é diferente daquele presente em drogas oxidantes. Ao invés de reagir com o oxigênio e produzir grandes quantidades de radicais livres contendo oxigênio, a artemisinina é convertida a um radical livre, que é alvo de proteínas específicas em uma reação catalizada por ferro (DHINGRA; RAO; NARASU, 1999).

Nenhuma citotoxicidade grave tem sido observada em humanos, possuindo a artemisinina uma dose letal ( $DL_{50}$ ) maior que a da cloroquinona, usualmente utilizada como medicação para tratamento de malária. Os principais efeitos adversos observados são dores de cabeça, febre, dor abdominal e diarreia. Entretanto, a ingestão de altas doses tem sido associada a danos neurológicos em experimentos observando cães e gatos. Em gestantes a administração da artemisinina ainda é limitada (DHINGRA; RAO; NARASU, 1999).

### **1.16 Efeito da Artemisinina contra *T. gondii***

Estudos prévios têm reportado a utilização de artemisinina e seus derivados sintéticos no controle da infecção *in vitro* por *T. gondii*. Holfels e colaboradores (1994) demonstraram uma diminuição do número de parasitos em células infectadas após administração de arteether. Sarciron e colaboradores (2000) mostraram que a utilização da combinação de artesunato e dihidroartemisinina induziu uma inibição do parasitismo celular *in vitro*. Em modelo murino houve uma diminuição de 40% de cistos do parasito nos animais que foram tratados pela combinação das drogas. Um estudo comparando a eficácia de quatro diferentes derivados de artemisinina em inibir a multiplicação de *T.*

*gondii* em cultura celular mostrou uma maior eficiência do artemether em relação aos demais derivados (JONES-BRANDO et al., 2006). Tem sido descrito também a utilização de artemisinina e seus derivados no controle de infecção por *Neospora caninum*, um parasito altamente similar ao *T. gondii* (KIM et al., 2002).

O mecanismo pelo qual artemisinina inibe a replicação de *T. gondii* ainda não foi totalmente elucidado. Estudos recentes têm demonstrado que este mecanismo envolve a secreção de proteínas de micronema que são cálcio-dependentes. Em estágios extracelulares do parasito, o retículo endoplasmático é realocado para o pólo apical, um sítio de alta atividade para a regulação da secreção de micronemas. Estes estudos demonstraram que a artemisinina interfere na homeostase de cálcio intracelular do parasito através da inibição do armazenamento do mesmo pelo retículo endoplasmático (NAGAMUNE, BEATTY, SIBLEY, 2007; NAGAMUNE, MORENO, SIBLEY, 2007).

### **1.17 Utilização do chá de *A. annua***

A atual farmacopéia da República da China lista oficialmente a utilização da erva seca de *A. annua* como remédio para febre e malária pelo preparo de uma infusão com uma dose diária de 4,5 a 9g da erva seca (RATH et al., 2004). Green e colaboradores (2000) preconizam o uso de 5g de erva seca por litro de água. Estudos realizados na China mostram que a utilização de 72 a 125g de erva seca por dia durante três dias consecutivos são altamente eficientes. Estudos têm mostrado que a infusão de *A. annua* é segura para o tratamento de malária em gestantes, sendo a LD<sub>50</sub> de 162,5g/Kg (WILLCOX et al., 2007). Um recente estudo com a utilização do chá de *A. annua* contra malária, nas condições recomendadas pela farmacopéia chinesa demonstrou um eficiente controle do parasitismo, entretanto, foi observado recrudescência da infecção, sugerindo a utilização de uma combinação com outros

antimaláricos (MUELLER et al, 2004). Pesquisas têm sido desenvolvidas com utilização de infusão de *A. annua* em medicina veterinária. Recentemente, Lans e colaboradores (2007) apresentaram essa utilização para o tratamento de verminoses e giardíase em porcos, assim como foi mostrado também uma diminuição de 81.6 a 83.2% do desenvolvimento de *Cryptosporidium parvum* em camundongos. Bhakuni e colaboradores (2001) demonstraram atividades biológicas do extrato de *A. annua*, dentre elas, atividade alergênica e controle de muitas infecções bacteriana tais como *Salmonella typhi*, *Proteus vulgares*, *Staphylococcus aureus*.

Nas ultimas duas décadas tem sido sugerido que a eficácia da planta *A. annua* é devido ao efeito sinérgico de seus vários componentes e que a combinação de constituintes resulta em uma total atividade antiplasmodial. Muitos polimetoxiflavonas como a casticin, artemetin, crisosplenetin e circilineol presentes no extrato podem contribuir para a atividade da artemisinina contra *P. falciparum* (BHAKUNI et al, 2001 BILIA et al., 2006). Entretanto, não há dados na literatura que comprovem o efeito da infusão de *A. annua* no controle da toxoplasmose, mas sim, relatos de estudos utilizando a artemisinina e seus derivados. Uma vez que a utilização da infusão se configura como uma forma segura e eficaz de tratamento para malária e outras parasitoses, o presente trabalho busca avaliar se a infusão de *Artemisia annua* tem efeito protetor na infecção por *Toxoplasma gondii* em cultura celular e em linhagem de camundongo susceptível a infecção.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos dos tratamentos *in vitro* e *in vivo* com extrato total da erva *Artemisia annua* L. sobre o controle da infecção aguda por *Toxoplasma gondii*.

### 2.2 Objetivos Específicos

Analisar a citotoxicidade do extrato total de *A. annua* em cultura de fibroblastos humanos por meio da determinação da viabilidade celular e da dose tóxica mediana (DT<sub>50</sub>).

Avaliar o efeito do tratamento *in vitro* com extrato total de *A. annua* em diferentes concentrações sobre fibroblastos humanos infectados com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*.

Avaliar o efeito do tratamento *in vitro* com extrato total de *A. annua* em diferentes concentrações sobre taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* antes da infecção de fibroblastos humanos.

Avaliar o efeito do tratamento *in vivo* com extrato total de *A. annua* sobre a infecção aguda com a cepa altamente virulenta (RH) ou cistogênica (ME49) de *T. gondii* em camundongos da linhagem C57BL/6.

Avaliar o efeito do tratamento *in vitro* com extrato total de *A. annua* em diferentes concentrações sobre a produção de citocinas e óxido nítrico por macrófagos murinos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Fêmeas de camundongos C57BL/6 e BALB/c com seis a dez semanas de idade foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, da Universidade de Campinas (UNICAMP) e roedores machos *Calomys callosus*, da linhagem Canabrava, com oito a doze semanas de idade foram cedidos gentilmente pela Profa. Dra. Eloísa Amália V. Ferro, Laboratório de Histologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo e Laboratório de Experimentação Animal (LEA) da UFU em condições padronizadas de criação, com ciclos de doze horas de luz e doze horas de escuro em salas com temperatura controlada ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991).

#### 3.2 Cultura de Células

Fibroblastos humanos (HFF) foram obtidos de *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA) e cultivados em garrafas de cultura de tecidos de  $25\text{ cm}^2$  até atingirem a confluência. As células foram cultivadas em meio RPMI completo, consistindo de meio RPMI-1640 (Gibco, Paisley, UK) suplementado com 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  estreptomicina (todos reagentes fornecidos por Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) e 10% soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil) em estufa umidificada a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ .

### 3.3 Parasitos

Parasitos da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos por meio de inoculação intraperitoneal em camundongos Swiss, através de passagens seriadas a intervalos de 48-72 horas de um inóculo de aproximadamente  $10^6$  taquizoítas obtidos do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados (MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1980). Os exsudatos peritoneais foram obtidos por meio de lavagem da cavidade abdominal com solução salina tamponada com fosfatos a 0,01 M (PBS, pH 7,2) estéril e, em seguida, as suspensões parasitárias foram submetidas a uma centrifugação rápida (720 x g, 5 minutos) para remover debris celulares do hospedeiro. O sobrenadante foi coletado e lavado por duas vezes (720 x g, 10 minutos, 4°C) com meio RPMI 1640. O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuspenso em 5 mL de meio RPMI 1640 e os parasitos viáveis foram contados em câmara hemocitométrica usando o corante azul de Tripán (0,4%) por exclusão vital. Cistos da cepa avirulenta (ME49) de *T. gondii* foram obtidos de tecido cerebral de *C. callosus* infectados 30-45 dias previamente por via oral com 20 cistos parasitários (Barbosa et al., 2007). Cérebros dos animais foram removidos, lavados em PBS e o material foi homogeneizado com auxílio de seringa e agulha (25 x 7 mm). O macerado foi então lavado por centrifugação a 1000 x g por 10 min e então, os cistos parasitários foram contados por microscopia óptica em aumento de 10 vezes.

### 3.4 Drogas

Sementes de *Artemisia annua* L. foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Pedro Melillo de Magalhães, do Centro Pluridisciplinar de pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP. As sementes foram semeadas em dezembro de 2005. As mudas foram formadas em bandejas de isopor de 72 células e 120 cm<sup>3</sup>, com substrato

enriquecido de adubo orgânico (esterco curtido, bagacilhos de cana, capim volumoso, farelo de soja e terra vegetal) que foram dispostas em casa de vegetação. Três meses após a semeadura efetuou-se o plantio de 19 plântulas na área experimental do Instituto de Ciências Agrárias (UFU) com um espaçamento de 1,0 x 0,6 m. As plantas foram colhidas antes do período de floração para se obter a máxima eficiência no aproveitamento do princípio ativo (artemisinina). As partes aéreas da planta (folhas e galhos) foram submetidas à secagem a 40°C por 48 horas (DUARTE et al, 2004) e, em seguida, à moagem em moinho do tipo Wiley e o material seco e moído foi armazenado em local de baixa umidade até a preparação do extrato total. O extrato total de *A. annua* foi preparado como infusão a partir de dez gramas da planta seca dissolvidos em 100 ml de água destilada fervida. A mistura foi ligeiramente agitada e coberta com gaze por 10 minutos, o material foi recuperado por filtração e a mistura foi resfriada à temperatura ambiente (RATH et al., 2004).

Sulfadiazina foi obtida comercialmente a uma concentração de 80 mg/L (Biopharma, Uberlândia, Brasil)

### **3.5 Ensaio de Citotoxicidade**

A citotoxicidade das drogas foi avaliada pela viabilidade celular de fibroblastos humanos utilizando a análise de MTT como descrito por Mosmann e colaboradores (1983). Fibroblastos ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram cultivados em placas de 96 poços, em triplicata, com meio RPMI completo na ausência ou presença de diluições duplas seriadas do extrato total de *A. annua* (2,5 a 0,08 mg/mL) ou sulfadiazina (200 a 1,56 µg/mL) por 24 h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Como controle, células foram incubadas somente com meio. Posteriormente, as células foram lavadas com meio e adicionadas de 10 µL de azul de tiazolil (MTT, Sigma Chemical Co.) na concentração de 5 mg/mL em 90 µL

de meio RPMI completo, 4 h antes do final da cultura. O sobrenadante foi removido e as partículas insolúveis de coloração roxa produzidas por células viáveis que metabolizaram o MTT foram então solubilizadas com 100 µL/poço de solução 10% de duodecil sulfato de sódio (SDS) e 50% N, N-dimetil formamida. Após 30 minutos de incubação, a densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor de placa (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, USA). Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle.

A dose citotóxica mediana (dose tóxica de 50% – DT<sub>50</sub>) de cada droga foi calculada por extrapolação da curva dose-resposta correspondente em um gráfico log-linear empregando as porções da curva que cruzaram o ponto que corresponde a 50% (JONES-BRANDO et al., 2006).

### **3.6 Efeito das drogas na infecção por *T. gondii* *in vitro***

Fibroblastos ( $1 \times 10^5$  células/poço/200 µL) foram cultivados em lamínulas de vidro redondas com 13 mm de diâmetro em placas de 24 poços a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. As monocamadas celulares foram então lavadas com meio RPMI e infectadas com taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* ( $2 \times 10^5$  parasitos/poço/200 µL) em uma proporção de 2 parasitos por célula (2:1). Após 3 horas de incubação, as células foram novamente lavadas para remover parasitos não aderentes e então tratadas com diluições duplas seriadas do extrato total de *A. annua* (2,5 a 0,08 mg/mL) ou sulfadiazina (200 a 1,56 µg/mL). Como controle, as células infectadas foram incubadas somente com meio de cultura por 24 horas.

Em outro experimento, parasitos foram pré-tratados por 1 h com as diferentes concentrações de drogas como acima descrito ou somente com meio de cultura (controle) e então incubados com monocamadas de fibroblastos em lamínulas de vidro

em uma taxa de infecção de 2:1 (parasitos:células) por 24 h a a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS, fixadas com formalina a 10% tamponada com fosfatos por 2 h e as lamínulas foram então coradas com azul de toluidina a 1% (Sigma Chemical Co.) por 5 segundos.

As lamínulas foram montadas em lâminas de microscopia e as células foram examinadas em microscopia de luz para avaliação dos parâmetros de índice de infecção (porcentagem de células infectadas por 100 células examinadas) e replicação intracelular do parasito (média do número de parasitos por célula em 100 células infectadas) (OLIVEIRA et al., 2006). Resultados foram expressos como a porcentagem de inibição de cada droga em relação ao controle, que foi estabelecido como 100% de infecção. A dose inibitória mediana (dose inibitória 50% – DI<sub>50</sub>) de cada droga foi também calculada como descrito anteriormente para DT<sub>50</sub>. Além disso, para cada droga foi também calculado o Índice Terapêutico (IT) de acordo com a seguinte fórmula: IT = DT<sub>50</sub> / DI<sub>50</sub>.

### **3.7 Efeito das drogas na infecção por *T. gondii* in vivo**

Inicialmente, 30 fêmeas de camundongos C57BL/6 foram infectados por via intraperitoneal com 10<sup>2</sup> taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* e então distribuídos em três grupos de 10 animais que foram tratados no mesmo dia do inóculo durante 5 dias, em intervalos regulares de 8 horas, como segue: (i) 10 mg/Kg/dia do extrato total de *A. annua* por via subcutânea; (ii) 400 mg/L/dia de sulfadiazina na água de bebida (Jeroen et al., 2005); e (iii) PBS (200 µl) por via subcutânea.

Em outra série de experimentos, 15 fêmeas de camundongos C57BL/6 foram infectadas por via intraperitoneal com 20 cistos cerebrais da cepa ME49 de *T. gondii* e então distribuídos em três grupos com cinco animais, os quais foram tratados como

descrito anteriormente. Um grupo controle adicional com cinco animais não infectados, mas tratados com 10 mg/Kg/dia de extrato total de *A. annua* por via subcutânea foi incluído. Os animais foram observados diariamente quanto à mortalidade e a morbidade foi analisada de acordo com um sistema baseado em escores como previamente descrito (BARTLEY et al., (2006), apresentando as seguintes características: (escore 0) pêlo normal e lustroso, manutenção do peso do animal em nível de pré-infecção, animal ativo; (escore 1) pêlo ouriçado/arrepiado, perda de 10% de peso, relutância em se movimentar, dorso arqueado; (escore 2) pêlo rígido, perda de 20% de peso. Todos os animais sobreviventes foram sacrificados 30 dias pós-infecção (dpi) e seus tecidos (cérebro, fígado e pulmão) foram coletados para análise imunohistoquímica, bioensaio em camundongos e reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de *T. gondii*.

### **3.8 Coloração por Hematoxilina e Eosina e ensaio de Imunohistoquímica**

Tecidos foram fixados em formalina 10% tamponada e embebidos em parafina seguindo os procedimentos histológicos de rotina. Cortes de tecidos com 4 µm de espessura (distância de 40 µm entre os cortes) foram obtidos em micrótomo e montados em lâminas de microscopia. Cortes foram corados por Hematoxilina Eosina (BARBOSA et al, 2006). Para imunolocalização dos parasitos, foi seguido o protocolo segundo (SILVA et al., 2002). Cortes foram desparafinizados e hidratados em concentração decrescente de alcoóis, e então incubados por 30 min à temperatura ambiente com 3% de peróxido de hidrogênio para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, cortes foram incubados com tampão citrato 0.2 M, pH 6.0, em microondas (um ciclo de 7 min) para resgate dos sítios antigênicos. Os cortes foram então incubados por 20 min a 37°C com 1% de soro albumina bovina em PBS para bloqueio dos sítios não específicos e, em seguida, com soro policlonal de coelho contra antígenos da cepa

RH de *T. gondii* diluído a 1:250 em PBS por 18 horas a 4°C. Como controle da reação, cortes em paralelo foram incubados com soro de coelho não-imune. Após dois ciclos de lavagens durante 3 min com PBS, foi adicionado o anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho diluído a 1:250 em PBS e incubado por 30min a 37°C. Após novo ciclo de lavagens, a reação foi revelada utilizando o complexo estreptavidina-peroxidase biotilada (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) a 1:250 em PBS por 30 minutos a 37°C. A reação foi desenvolvida pela adição do substrato enzimático consistindo de diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio em tabletes (Sigma Chemical Co.) por 5 min. As lâminas foram então submetidas à contracoloração com hematoxilina de Harrys e examinadas em microscopia de luz.

### **3.9 Bioensaio em camundongo**

Detecção de *T. gondii* nos animais sobreviventes foi avaliada por meio de bioensaio em camundongos como descrito anteriormente (FREYRE et al., 2006). Tecidos cerebrais foram homogeneizados em 2 mL de PBS e separadamente inoculados 200µl por via intraperitoneal em camundongos BALB/c. Os animais foram observados diariamente quanto à mortalidade ou morbidade e amostras de sangue dos animais sobreviventes foram coletadas e analisadas quanto à soroconversão por meio da detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* por ELISA (BARBOSA et al., 2006).

### **3.10 PCR para detecção de DNA de *T. gondii***

A presença de DNA de *T. gondii* em tecido cerebral dos animais sobreviventes foi investigada por PCR (GRIGG; BOOTHROYD, 2001). Tecido cerebral foi tratado com 100 mg/mL de proteinase K (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil) em tampão contendo 10 mM Tris-HCl, 0.1 M EDTA, 0.5% SDS (pH 8.0) a 50°C por 3 h.

Amostras foram então submetidas à extração por fenol/clorofórmio/alcoolisoamil (25:24:1, pH 8.0) e o DNA foi precipitado da fase aquosa por tratamento com 2,5 volumes de etanol gelado. PCR qualitativo foi realizado para detecção de 35 cópias do gene B1 de *T. gondii* usando os primers 5'TCTTCCCAGAGGTGGATTTC-3'(sense, 151-171 nucleotídeos) e 5'CTCGACAATACGCTGCTTG-3'(antisense, 682-663 nucleotídeos) (Invitrogen Life Technologies), os quais amplificam um fragmento de 531 bp. Após incubação inicial por 3 min a 95°C, as amostras foram submetidas a 38 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento por 1,2 min a 62°C, e extensão por 2 min a 72°C (SILVA et al., 2002). Produtos da PCR foram analisados em gel de 1% de agarose contendo 0.5 mg/mL of brometo de etídeo e visualizados sob iluminação de ultra-violeta.

### **3.11 Determinação da produção de nitrito e citocinas**

Camundongos C57BL/6 foram inoculados por via intraperitoneal com 1 mL de 3% de meio tioglicolato estéril (w/v). Após 4 dias, macrófagos foram coletados da cavidade intraperitoneal por lavagem com PBS estéril. Células ( $1 \times 10^5$  cells/poço) foram cultivadas em placas de 24 poços por 24 h com meio RPMI completo a 37° e 5% CO<sub>2</sub> (SEABRA et al., 2002). Após este período, as células foram estimuladas, em triplicata, com diluições duplas seriadas do extrato total de *A. annua* de 10 a 0,65 mg/mL. Como controles positivo e negativo, as células foram estimuladas com 1 ng/mL de IFN- $\gamma$  (PharMingen, California, USA) e 10  $\mu$ g/mL de LPS (Sigma Chemical Co.) ou somente com meio, respectivamente, sob as mesmas condições de cultivo. Sobrenadantes de cultura foram coletados após 24 e 48 h de incubação a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>e analisados quanto à presença de nitrito (SEABRA et al., 2002).

Em resumo, 100  $\mu$ L de sobrenadante de cada poço separadamente, foram adicionados (v/v) ao reagente de Griess (0,1% *N*-1-naphthyl-ethylenediamina em água destilada e 1% sulfanilamida em 5% ácido fosfórico) em placas de 96 poços. Valores de absorbância foram lidos a 570 nm em leitor de placas e a concentração de nitrito foi calculada por comparação com uma curva padrão usando nitrito de sódio.

Níveis de IL-12 e TNF- $\alpha$  também foram quantificados em sobrenadantes de cultura de macrófagos, após 24 e 48 h de estimulação com diferentes concentrações do extrato de *A. annua* como descrito acima. Níveis de citocinas foram determinados pela técnica de ELISA sanduíche de acordo com as instruções do fabricante (PeProtech, Veracruz, México) por meio da comparação com uma curva padrão construída com citocinas murinas recombinantes. A sensibilidade de detecção do teste foi de 78 pg/mL para IL-12 e 390 pg/mL para TNF- $\alpha$ .

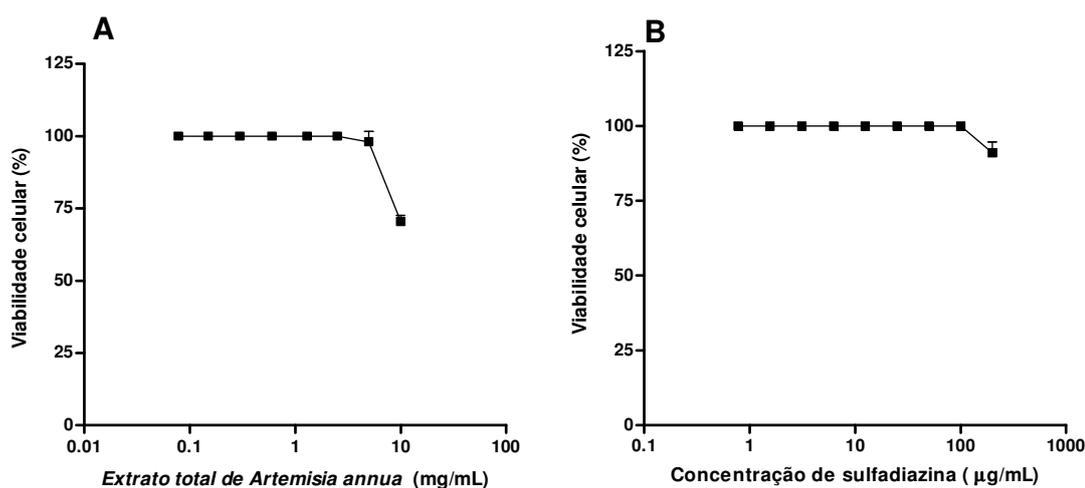
### 3.12 Análise Estatística

O método de Kaplan-Meier foi usado para comparar as taxas de sobrevivência entre os grupos estudados (FLETCHER et al., 1996) e as curvas de sobrevivência foram comparadas usando o teste do  $\chi^2$ . Níveis de citocinas foram analisados por teste *t* de Student. A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Atividade citotóxica do extrato total de *A. annua*

A porcentagem de viabilidade celular de fibroblastos humanos (HFF) na presença de diferentes concentrações de extrato total de *A. annua* e sulfadiazina foi determinada. Foram observadas taxas em torno de 70% de viabilidade celular mesmo quando as mais altas concentrações de extrato total de *A. annua* (Fig. 6A) e sulfadiazina (Fig. 6B) (10 mg/mL e 200 µg/mL) respectivamente, foram utilizadas.



**Figura 6. Atividade citotóxica do extrato de *Artemisia annua* L. *in vitro* determinada por ensaios de MTT.** Fibroblastos humanos foram cultivados em placas de cultura de 96 poços na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações de (A) extrato total de *A. annua* ou (B) sulfadiazina por 24 h. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle.

### 4.2 Efeito do extrato total de *A. annua* na infecção *in vitro* por *T. gondii*

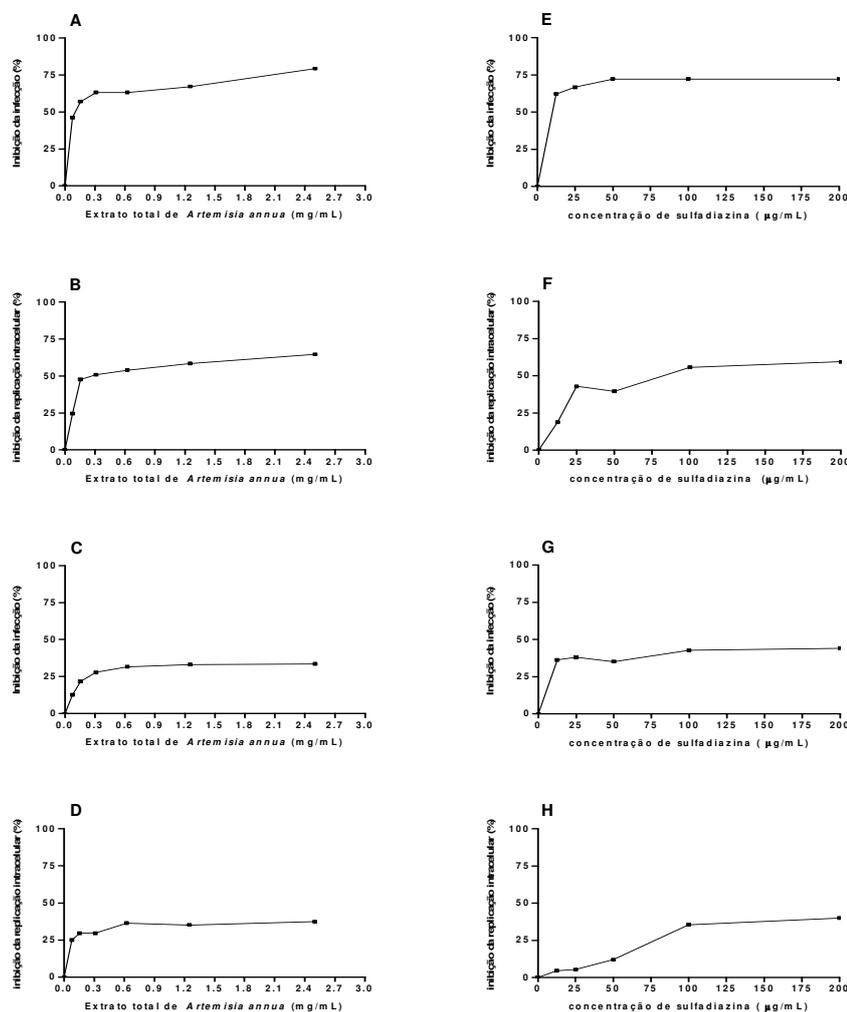
Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações do extrato total de *A. annua* e de sulfadiazina contra a invasão e replicação celular de *T. gondii* em fibroblastos humanos sob duas diferentes condições de tratamento (Fig. 7).

#### **4.2.1 Pré-tratamento de taquizoítas de *T. gondii* com extrato total de *A. annua* ou sulfadiazina antes da infecção de fibroblastos humanos**

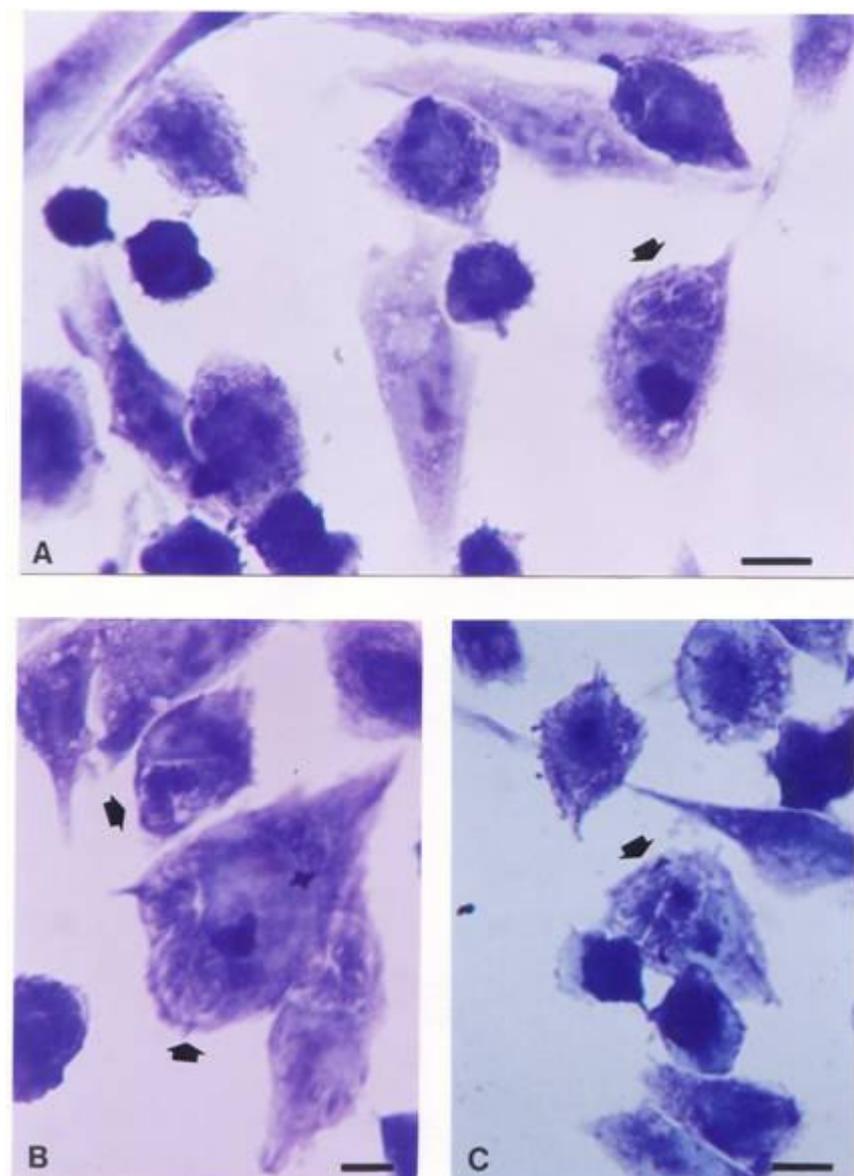
Em relação ao pré-tratamento de taquizoítas de *T. gondii* com diferentes concentrações do extrato total de *A. annua*, foi observada uma curva de inibição dose-resposta que alcançou taxas em torno de 75% de inibição para ambos parâmetros analisados, índice de infecção e taxa de replicação intracelular (Figs. 7A e 7B). Resultados similares foram encontrados quando os parasitos foram pré-tratados com diferentes concentrações de sulfadiazina (Figs. 7E e 7F), embora taxas de inibição ligeiramente maiores da replicação intracelular do parasito foram observadas quando os parasitos foram pré-tratados com o extrato total da planta em relação ao tratamento com sulfadiazina.

#### **4.2.2 Tratamento com extrato total de *A. annua* ou sulfadiazina de fibroblastos humanos previamente infectados com taquizoítas de *T. gondii***

Nessa condição, o tratamento com diferentes concentrações do extrato total de *A. annua* de fibroblastos humanos infectados com taquizoítas de *T. gondii* também mostrou uma curva de inibição dose-resposta, com taxas em torno de 30% de inibição tanto para a avaliação do índice de infecção quanto para a taxa de replicação intracelular do parasito (Fig. 7C e 7D). O tratamento das células, previamente infectadas, com diferentes concentrações de sulfadiazina mostrou resultados similares, embora taxas de inibição ligeiramente maiores foram observadas somente com relação ao índice de infecção (Figs. 7G e 7H). Fotomicrografias relativas ao ensaio são mostradas na Figura 8.



**Figura 7.** Efeito do tratamento com extrato total de *Artemisia annua* L. ou sulfadiazina sobre o índice de infecção e replicação intracelular de *Toxoplasma gondii* em fibroblastos humanos. Índice de infecção (A) e replicação intracelular do parasito (B) em fibroblastos humanos infectados com parasitos pré-tratados com extrato total de *A. annua*; Índice de infecção (C) e replicação intracelular do parasito (D) em fibroblastos humanos infectados e posteriormente tratados com extrato total de *A. annua*; Índice de infecção (E) e replicação intracelular do parasito (F) em fibroblastos humanos infectados com parasitos pré-tratados com sulfadiazina; Índice de infecção (G) e replicação intracelular do parasito (H) em fibroblastos humanos infectados e posteriormente tratados com sulfadiazina.



**Figura 8** Fotomicrografias de fibroblastos humanos (HFF) infectados com *T. gondii*: (A) HFF infectados e não tratados, (B) HFF infectadas e tratadas com extrato de *A. annua*. (C) Taquizoítas de *T. gondii* foram pré-tratados com extrato de *A. annua* antes da infecção em HFF. Setas indicam vacúolos com presença do parasito. Barras representam 22 $\mu$ m.

Com base nos resultados obtidos referentes à citotoxicidade das drogas, determinada pela viabilidade celular, e índices de inibição da infecção pelo parasito, a dose tóxica de 50% (DT<sub>50</sub>), a dose inibitória de 50% (DI<sub>50</sub>) e o correspondente índice terapêutico (IT) para ambas as drogas nas duas diferentes condições de tratamento foram calculados e estão demonstrados na Tabela 1.

Na condição de pré-tratamento de taquizoítas de *T. gondii* com as drogas antes da infecção de fibroblastos humanos com o parasito, o extrato total de *A. annua* apresentou DI<sub>50</sub> de 103,6 µg/mL e DT<sub>50</sub> de 56.409 µg/mL. Para o tratamento com sulfadiazina, os valores corresponderam a DI<sub>50</sub> de 2,5 µg/mL e DT<sub>50</sub> de 485,9 µg/mL. Portanto, o IT calculado para o extrato total de *A. annua* (IT = 544,5) foi melhor que aquele encontrado para sulfadiazina (IT = 194,4). Por outro lado, sob a condição de tratamento de fibroblastos humanos após a infecção com taquizoítas de *T. gondii*, valores baixos e similares de IT foram determinados para ambas as drogas analisadas (IT = 4,8 para o extrato total de *A. annua* e IT = 6,1 para sulfadiazina).

**Tabela 1.** Inibição *in vitro* da infecção por *Toxoplasma gondii* em fibroblastos humanos pela administração do extrato total de *Artemisia annua* L. ou sulfadiazina sob diferentes condições de tratamento.

Tratamento	Drogas	DI <sub>50</sub> <sup>c</sup> (µg/mL)	DT <sub>50</sub> <sup>d</sup> (µg/mL)	IT <sup>e</sup>
Pré- infecção <sup>a</sup>	Extrato total de <i>A. annua</i>	103,6	56.409,0	544,5
	Sulfadiazina	2,5	485,9	194,4
Pós- infecção <sup>b</sup>	Extrato total de <i>A. annua</i>	11.666,9	56.409,0	4,8
	Sulfadiazina	79,6	485,9	6,1

<sup>a</sup> Tratamento de taquizoítas de *T. gondii* com as drogas antes da infecção de fibroblastos humanos;

<sup>b</sup> Tratamento de fibroblastos humanos com as drogas após a infecção por taquizoítas de *T. gondii*;

<sup>c</sup> DI<sub>50</sub>: Dose inibitória de 50%;

<sup>d</sup> DT<sub>50</sub>: Dose tóxica de 50%;

<sup>e</sup> IT: Índice terapêutico = DT<sub>50</sub>/DI<sub>50</sub>

#### 4.3 Efeito do extrato total de *A. annua* na infecção *in vivo* por *T. gondii*

Camundongos foram infectados com a cepa RH virulenta ou com a cepa ME49 cistogênica avirulenta de *T. gondii* e submetidos a tratamento com as diferentes drogas, e as curvas de mortalidade e morbidade foram analisadas (Fig. 9).

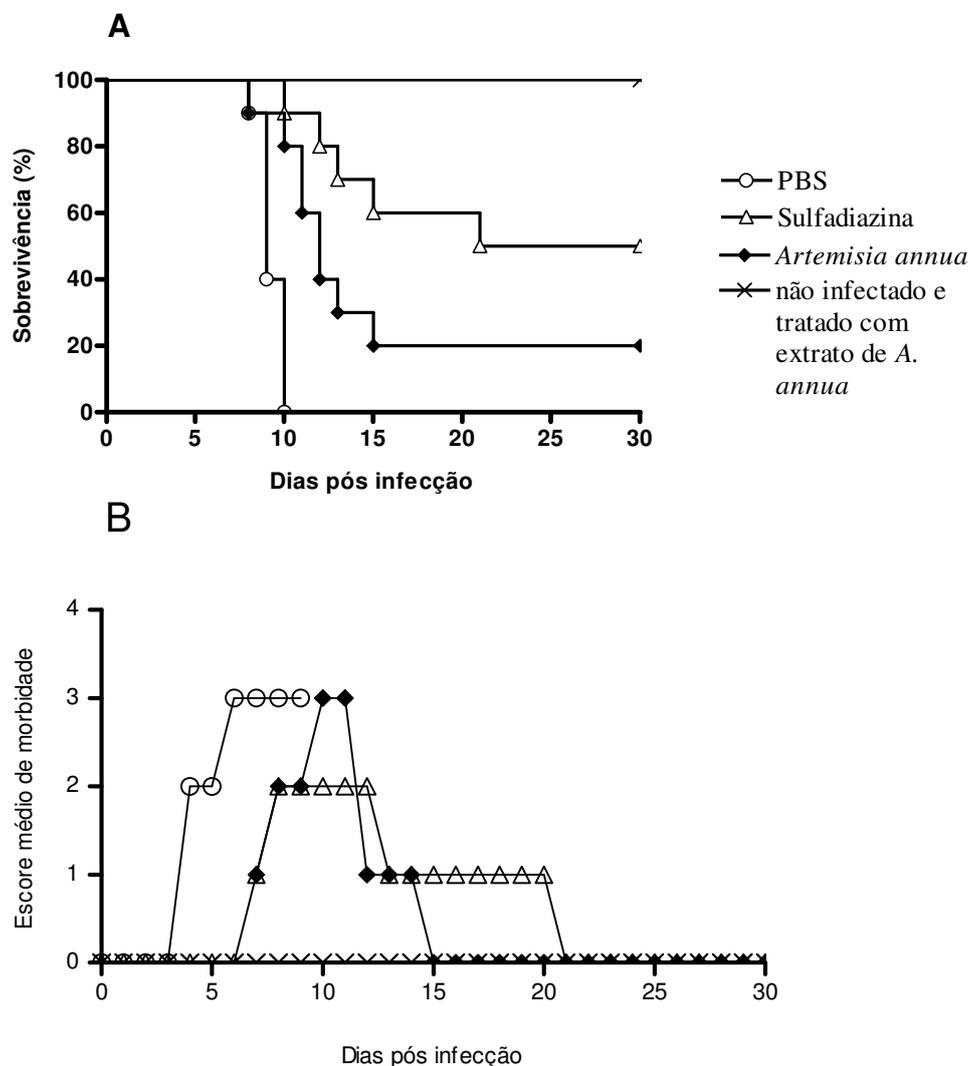
##### 4.3.1. Análise da mortalidade e morbidade de camundongos infectados com a cepa RH de *T. gondii*

Curvas de sobrevivência de camundongos infectados com a cepa RH (Fig. 9A) não apresentaram diferenças significativas entre o tratamento com extrato total de *A. annua* (taxa de sobrevivência de 20% aos 30 dpi e sobrevivência mediana de 12 dias) e sulfadiazina (taxa de sobrevivência de 50% aos 30 dpi e sobrevivência mediana de 25,5

dias) ( $P = 0,0820$ ). Entretanto, as curvas de sobrevivência dos animais submetidos a ambos tratamentos foram significativamente maiores que aquela dos animais infectados e tratados com PBS (grupo controle) que morreram aos 10 dpi (sobrevivência mediana de nove dias) ( $P = 0,0007$ ). Como esperado, todos os animais não infectados e tratados com o extrato total de *A. annua* sobreviveram até o final do experimento.

Analisando as curvas de escores de morbidade (Fig. 9B), os animais tratados com o extrato total de *A. annua* desenvolveram pêlo arrepiado/ouraçado aos 6 dpi e a partir do 7<sup>o</sup> dpi foram observados sintomas clínicos adicionais como resistência para se mover e curvatura do dorso. Houve uma perda de 10% do peso médio do grupo aos 10 dpi, entretanto, a partir do 15<sup>o</sup> dpi os animais sobreviventes não apresentaram sintomas clínicos até o final do experimento.

Curvas similares de escores de morbidade foram observadas para os animais tratados com sulfadiazina, embora os sinais clínicos foram observados até o 21<sup>o</sup> dpi. Animais do grupo controle infectados e tratados com PBS apresentaram sinais clínicos mais precoces (3 dpi) e escores máximos de morbidade foram alcançados entre 6 e 9 dpi, quanto todos os animais desse grupo morreram.

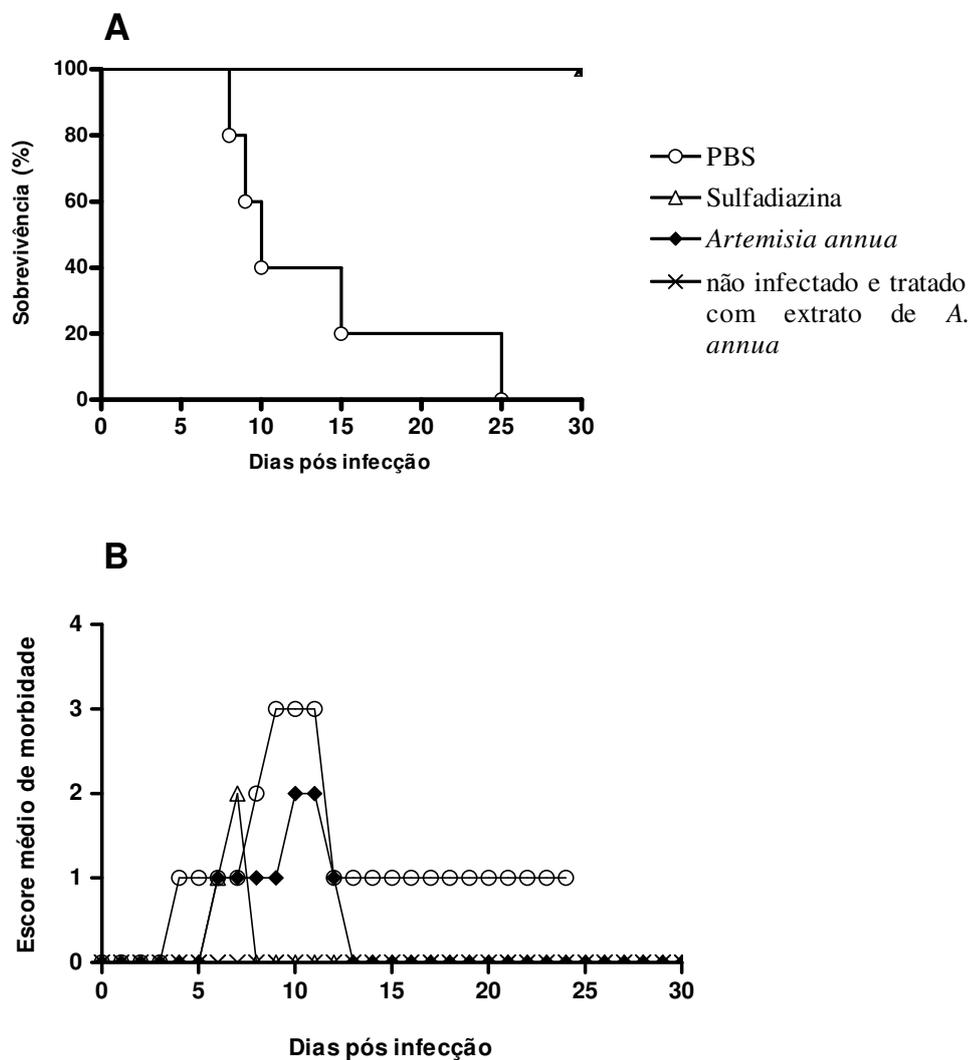


**Figura 9. Curvas de sobrevivência e escores médios de morbidade de camundongos C57BL/6 após infecção com a cepa virulenta (RH) de *T. gondii*.** Animais foram tratados logo após a infecção ( $10^2$  taquizoítas via intraperitoneal) com o extrato total de *A. annua* (10 mg/Kg/dia; via subcutânea) ou com sulfadiazina (400 mg/L; água de bebida) durante 5 dias em intervalos de 8 horas. Como controle, animais foram infectados com o parasito e tratados com PBS ou não foram infectados e tratados somente com o extrato total de *A. annua* (10 mg/Kg/dia).

#### **4.3.2. Análise da mortalidade e morbidade de camundongos infectados com a cepa ME49 de *T. gondii***

Curvas de sobrevivência de camundongos infectados com a cepa avirulenta ME49 de *T. gondii* estão ilustradas na Figura 10A. Taxas de 100% de sobrevivência aos 30 dpi foram encontradas para ambos os tratamentos com o extrato total da planta e sulfadiazina. Entretanto, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a curva de sobrevivência dos animais submetidos a ambos tratamentos e aquela do grupo controle (animais infectados e tratados com PBS), no qual todos os animais morreram até o 25<sup>o</sup> dpi (sobrevivência mediana de 10 dias) ( $P = 0,0001$ ).

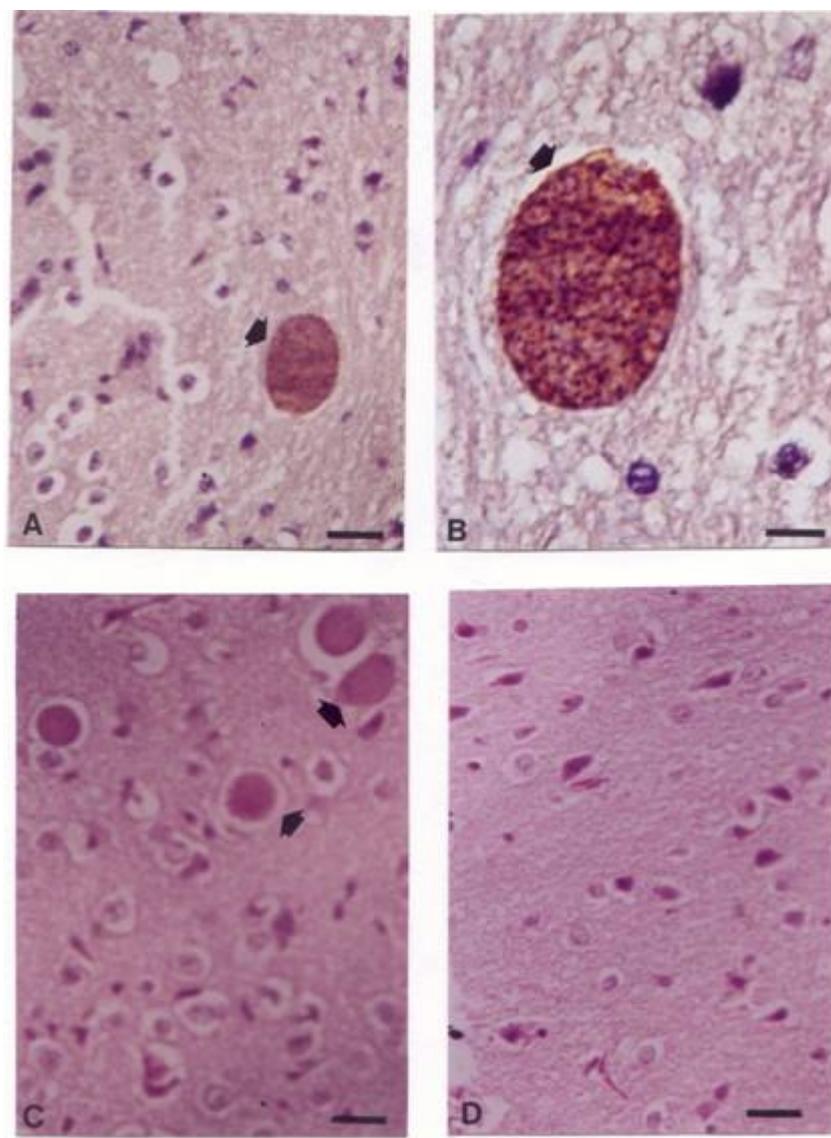
As curvas de escores de morbidade foram similares para ambos tratamentos com as drogas (Fig. 10B), embora os animais tratados com o extrato total de *A. annua* apresentaram sinais clínicos entre 6 e 13 dpi, enquanto os animais tratados com a sulfadiazina apresentaram sinais clínicos de 6 a 8 dpi. Por outro lado, animais controles infectados e tratados com PBS apresentaram escores de morbidade mais altos, mais precocemente e por um maior período de tempo (3 a 24 dpi).



**Figura 10.** Curvas de sobrevivência e escores médios de morbidade de camundongos C57BL/6 após infecção com a cepa avirulenta (ME49) de *T. gondii*. Animais foram tratados logo após a infecção (20 cistos cerebrais, via intraperitoneal) com o extrato total de *A. annua* (10 mg/Kg/dia; via subcutânea) ou com sulfadiazina (400 mg/L; água de bebida) durante 5 dias em intervalos de 8 horas. Como controle, animais foram infectados com o parasito e tratados com PBS ou não foram infectados e tratados somente com o extrato total de *A. annua* (10 mg/Kg/dia).

#### 4.4 Detecção de *T. gondii* nos tecidos

Os animais sobreviventes aos 30 dpi foram sacrificados e amostras de tecido (fígado e cérebro) foram colhidas para detecção de *T. gondii*. Nenhum parasitismo de tecido foi observado por imunohistoquímica no cérebro e no fígado dos animais sobreviventes que haviam sido infectados com a cepa RH de *T. gondii* e submetidos ao tratamento com o extrato total de *A. annua* ou sulfadiazina, ou daqueles infectados com a cepa ME49 e tratados com sulfadiazina (Tabela 2). Entretanto, todos os animais infectados com a cepa ME49 e tratados com o extrato total de *A. annua* mostraram a presença de cistos no tecido cerebral revelados por imunohistoquímica (Fig. 11).



**Figura 11. Fotomicrografia de tecido cerebral de camundongos (C57/BL6) infectados com cepa ME49 de *T. gondii* e tratados imediatamente após a infecção com 10 mg/Kg/dia de extrato total de *A. annua*. Setas mostram cisto parasitário. (A, B) aumento de 40X e 100X respectivamente; (C, D) Coloração por Hematoxilina e Eosina; (C) cistos teciduais, (D) tecido não parasitado. Barras representam 22 $\mu$ m.**

Em relação ao bioensaio em camundongos, todos os animais sobreviventes infectados com as cepas RH ou ME49 de *T. gondii* e submetidos ao tratamento com o extrato total de *A. annua* ou sulfadiazina demonstraram a presença de parasitos viáveis ou antígenos parasitários em tecidos cerebrais, como demonstrado por resultados positivos encontrados para a mortalidade e soroconversão, respectivamente (Tabela 2). Resultados de PCR confirmaram a presença de DNA de *T. gondii* em tecido cerebral de animais sobreviventes infectados com as cepas RH ou ME49 e tratados com o extrato total de *A. annua* ou sulfadiazina (Tabela 2 e Fig. 12).



**Figura 12. Análise representativa de PCR de 35 cópias do gene B1 em tecido cerebral de camundongos C57BL/6 coletado após 30 dias de infecção com a cepa RH ou ME49 de *Toxoplasma gondii* e submetidos ao tratamento com o extrato total de *A. annua* ou sulfadiazina. (1) marcador de peso molecular DNA; (2) DNA de taquizoíta de *T. gondii* (cepa RH); (3) tecido cerebral de camundongo não infectado; (4 e 5) tecido cerebral de camundongo infectado com a cepa RH de *T. gondii* e tratado com extrato total de *A. annua*; (6, 7, 8, 9 e 10) tecido cerebral de camundongos infectados com a cepa RH de *T. gondii* e tratados com sulfadiazina; (11, 12, 13, 14 e 15) tecido cerebral de camundongos infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* e tratados com extrato total de *A. annua*; (16, 17, 18, 19 e 20) tecido cerebral de camundongos infectados com a cepa ME49 de *T. gondii* e tratados com sulfadiazina.**

**Tabela 2.** Resultados comparativos de imunohistoquímica, bioensaio em camundongos e PCR em animais sobreviventes após infecção por *Toxoplasma gondii* e tratamento por extrato total de *A. annua* ou sulfadiazina.

Infecção por <i>T. gondii</i> <sup>a</sup>	Tratamento <sup>b</sup>	Animais sobreviventes	Imunohistoquímica		Bioensaio em camundongos		PCR <sup>c</sup>
			Cérebro	Fígado	Mortalidade	Soroconversão	
Cepa RH	Extrato total de <i>A. annua</i>	2/10	0/2	0/2	2/2	ND	2/2
	Sulfadiazina	5/10	0/5	0/5	4/5	1/1	5/5
Cepa ME49	Extrato total de <i>A. annua</i>	5/5	5/5	0/5	4/5	1/1	5/5
	Sulfadiazina	5/5	0/5	0/5	4/5	1/1	5/5

<sup>a</sup> Infecção foi realizada com 10<sup>2</sup> taquizoítas da cepa RH ou com 20 cistos da cepa ME49 de *T. gondii* por via intraperitoneal;

<sup>b</sup> Tratamento foi realizado logo após a infecção com extrato total de *A. annua* (10 mg/Kg/dia em intervalos de 8 horas por 5 dias) ou com sulfadiazina (400 mg/L/dia na água de beber por 5 dias);

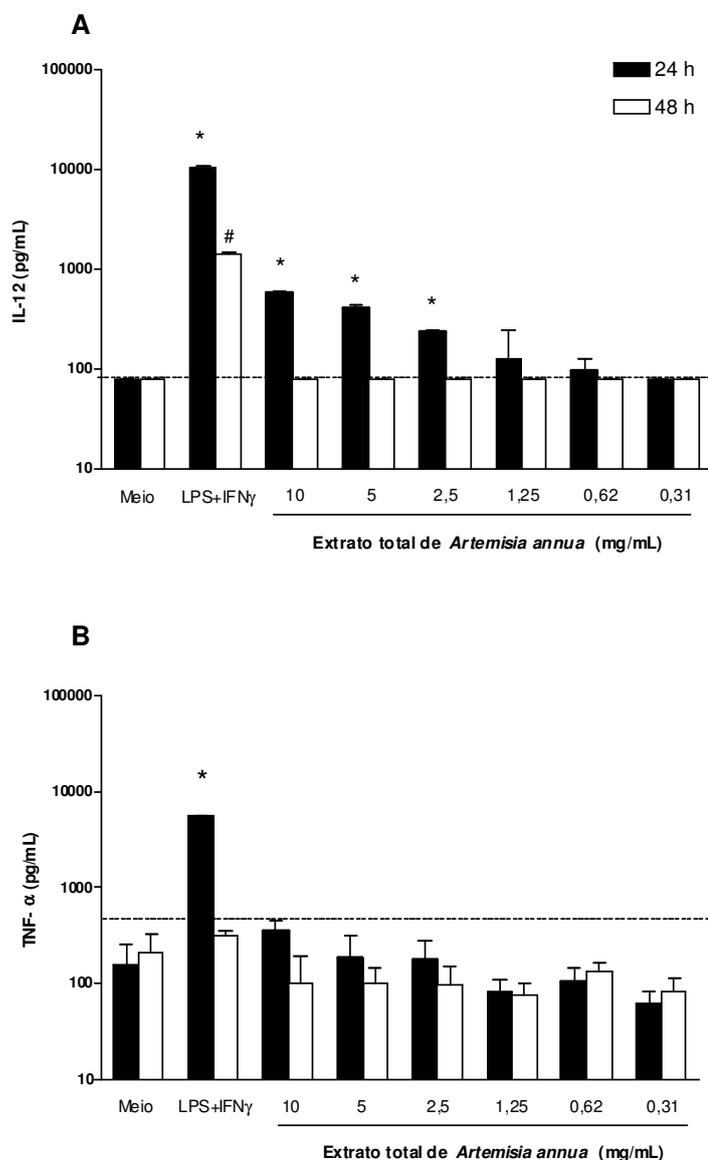
<sup>c</sup> PCR foi realizada em tecido cerebral como descrito em Material e Métodos.

ND: não realizado.

#### **4.5 Determinação da produção de citocinas e nitrito em sobrenadantes de macrófagos murinos após estimulação com diferentes concentrações de extrato total de *A. annua***

Sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais murinos foram analisados para a detecção de citocinas ou nitrito após a estimulação com diferentes concentrações do extrato total de *A. annua* (Fig. 13). Níveis de IL-12 foram significativamente aumentados após 24 horas de estimulação com as mais altas concentrações do extrato total de *A. annua* (10, 5 e 2,5 mg/mL) em relação ao meio de cultura ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 13A). Em contraste, níveis detectáveis de TNF- $\alpha$  não foram encontrados após 24 ou 48 h de estimulação dos macrófagos com as diferentes concentrações do extrato total de *A. annua* (Fig. 13B). Controles positivos (LPS+IFN- $\gamma$ ), entretanto, apresentaram níveis de IL-12 significativamente aumentados após 24 e 48 h de estimulação ( $P < 0,0001$ ), enquanto que níveis significantes de TNF- $\alpha$  só foram observados após 24 h da adição do estímulo ( $P < 0,0001$ ).

Níveis detectáveis de nitrito não foram encontrados após a estimulação de macrófagos murinos com as diferentes concentrações do extrato total de *A. annua* (dados não mostrados).



**Figura 13. Quantificação de citocinas em sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais após 24 h e 48 h de estimulação com diferentes concentrações do extrato total de *A. annua*. Níveis de IL-12 (A) e TNF- $\alpha$  (B) foram determinados por ELISA sanduíche. Resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão obtidas de culturas em triplicata. \*  $P < 0,0001$  in relação ao meio para sobrenadantes de cultura após 24 h; #  $P < 0,0001$  em relação ao meio para sobrenadantes de cultura após 48 h.**

## 5. DISCUSSÃO

*T. gondii* é um parasito capaz de infectar qualquer célula nucleada do hospedeiro, sua distribuição é cosmopolita e estima-se que um terço da população mundial já tenha entrado em contato com o parasito (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). A ingestão de água ou alimentos contaminados facilita a transmissão principalmente em áreas de baixas condições sócio-econômicas, nas quais as taxas de prevalência do parasito chegam a 70% (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Devido a sua importância médica direcionada a grupos como gestantes e imunocomprometidos, nos quais os efeitos da infecção são mais acentuados, inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas, inclusive envolvendo os aspectos etnofarmacológicos, no âmbito de gerar medicamentos novos e mais eficazes, que possam atuar contra todos os estágios evolutivos do parasito e apresentem pouco efeito adverso ao paciente (FERREIRA et al., 2006; LANS, 2007; PETERSEN, 2007).

Tendo em vista esta problemática, neste estudo, nós avaliamos o efeito da administração da infusão de uma planta milenarmente utilizada na medicina chinesa, para o tratamento de infecções por parasitos do gênero *Plasmodium*, porém no tratamento *in vitro* e *in vivo* da infecção por *T. gondii*, uma vez que ambos parasitos são pertencentes ao mesmo filo.

### 5.1 Toxicidade e eficiência das drogas sobre a infecção por *T. gondii in vitro*

O ensaio de citotoxicidade demonstrou que o extrato total de *A. annua* apresentou baixa toxicidade para fibroblastos humanos ( $DT_{50} = 56,409 \mu\text{g/mL}$ ) enquanto a sulfadiazina, como medicação de usual escolha para o tratamento da toxoplasmose, apresentou alta toxicidade ( $DT_{50} = 485 \mu\text{g/ml}$ ), confirmando relatos anteriormente

descritos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; MARTINS-DUARTE, 2006; PETERSEN, 2007). Esta alta toxicidade apresentada pela sulfadiazina gera muitos transtornos durante o tratamento da infecção, como por exemplo, náuseas, tonteados e principalmente supressão da medula óssea, sendo este inclusive um dos principais motivos pelos quais novas drogas têm sido estudadas (MOSHKANI; DALIMI, 2000; DUNAY et al., 2004; FERREIRA et al., 2006). Nossos dados demonstram, portanto, a utilização favorável do extrato da planta em relação ao tratamento convencional com sulfadiazina, provendo assim uma base para estudos com objetivo de testar a eficácia do extrato de *A. annua* utilizando modelos *in vivo*.

A eficácia do extrato total de *A. annua* no controle da toxoplasmose foi investigada *in vitro* em culturas celulares de fibroblastos humanos em duas diferentes condições de tratamento e comparadas com a medicação usual - sulfadiazina. Na primeira condição, parasitos da cepa RH de *T gondii* foram pré-tratados com diferentes concentrações do extrato total de *A. annua* ou sulfadiazina e então adicionados à cultura de fibroblastos, resultando em doses inibitórias de  $DI_{50} = 103,6 \mu\text{g/mL}$  para o extrato e  $DI_{50} = 2,5 \mu\text{g/mL}$  para a sulfadiazina, indicando que uma menor quantidade em massa desta última droga foi capaz de inibir a infecção pelo parasito. Entretanto, para que se possa comparar a real efetividade das drogas contra o parasito, um índice terapêutico foi calculado levando-se em conta não somente a capacidade inibitória de infecção, mas também a sua toxicidade para as células. Desta forma, o extrato total de *A. annua* mostrou ser três vezes mais eficiente que a sulfadiazina ( $IT = 544.5$  versus  $IT = 194.4$ ), evidenciando assim que o extrato da planta parece agir de forma mais direta e efetiva sobre o parasito.

Em uma segunda condição, o tratamento de fibroblastos humanos infectados com a cepa RH de *T. gondii* com o extrato total de *A. annua* ou sulfadiazina apresentou

índices terapêuticos similares e, portanto, eficácia comparável entre as duas drogas. Neste contexto, estudos relatam que muitas drogas convencionais, como os inibidores de folato, bem como novas drogas como a atovaquone, utilizadas no tratamento da toxoplasmose em humanos apresentam uma alta atividade anti-*Toxoplasma*, porém alta toxicidade, o que exclui uma ampla utilização destas drogas, principalmente durante períodos prolongados de tempo (JONES-BRANDO et al., 2006). Sarciron e colaboradores (2000) investigando o efeito de artemisinina e derivados sintéticos no controle da infecção de células da linhagem mielomonocítica (THP-1) infectadas com uma cepa avirulenta (DUR) de *T. gondii*, também observou que o crescimento do parasito não foi completamente inibido, apresentando taxas de inibição do parasito em torno de 70%. Holfels e colaboradores (1994) demonstraram, entretanto, uma eficiente inibição dose-dependente da infecção pela cepa RH de *T. gondii* em linhagens de enterócitos tratadas com artemeter, um derivado semi-sintético da artemisinina.

Em nossos experimentos *in vitro*, ficou evidenciado que o pré-tratamento de taquizoítas de *T. gondii* com o extrato total de *A. annua* antes da infecção de fibroblastos humanos apresentou uma maior eficiência no controle da infecção do que o tratamento com o extrato da planta em células já infectadas com o parasito. Resultados contraditórios foram observados em um estudo de inibição do crescimento de *T. gondii* por artemisinina (qinghaosu), no qual não foi observado nenhum efeito do pré-tratamento do parasito ou da célula antes da infecção (OU-YANG et al., 1990). Nossos resultados sugerem que o extrato total de *A. annua* parece agir mais diretamente contra o parasito do que nas células infectadas. Um estudo recente demonstrou que a artemisinina altera os níveis de cálcio intracelulares, alternando a secreção de proteínas de micronema do parasito, utilizadas nos processos de invasão celular (NAGAMUNE, BEATTY, SIBLEY, 2007; NAGAMUNE, MORENO, SIBLEY, 2007).

## **5.2 Efeito do tratamento com as drogas sobre a infecção por *T. gondii* in vivo**

Experimentos em camundongos C57BL/6 infectados com a cepa virulenta (RH) de *T. gondii* evidenciaram que nem o extrato total de *A. annua* nem o medicamento usual (sulfadiazina) foram capazes de controlar completamente a infecção, com taxas de sobrevivência de 20% e 50%, respectivamente. Entretanto, as curvas de sobrevivência foram significativamente diferentes dos animais infectados e tratados somente com PBS (controle). Apesar da maior taxa de sobrevivência observada com a administração de sulfadiazina, as curvas de sobrevivência entre esta droga e o extrato da planta não foram significativamente diferentes entre si. Desse modo, o extrato total de *A. annua* configura-se como um potente candidato terapêutico em estudos adicionais, principalmente devido a sua menor toxicidade em relação à sulfadiazina.

Um recente estudo avaliando drogas alternativas como PHNQ6, sozinha ou combinada com sulfadiazina, para controlar a infecção por *T. gondii* com a cepa RH em camundongos mostrou que o tratamento convencional com sulfadiazina não foi capaz de controlar totalmente a infecção, alcançando taxas de sobrevivência de 60%. Entretanto, quando a associação de fármacos foi utilizada, taxas de sobrevivência dos animais chegaram a 70% (FERREIRA et al., 2006). Desse modo, o uso de terapia combinada com o extrato total de *A. annua* deve ser tema de investigações adicionais. Quando camundongos foram infectados pela cepa ME49 de *T. gondii*, nossos resultados demonstraram controle efetivo da infecção pela administração tanto do extrato total de *A. annua* bem como de sulfadiazina. Entretanto, os escores de morbidade obtidos para ambas as drogas variaram ligeiramente. Animais tratados com o extrato da planta apresentaram sinais e sintomas clínicos mais tardios e de maior duração quando comparados com os animais tratados com sulfadiazina, porém a intensidade dos

sintomas foi similar. Para os animais infectados com a cepa RH, entretanto, os animais tratados com o extrato da planta apresentaram sintomas mais acentuados, porém por um período de mais curta duração, quando comparado com os animais tratados com sulfadiazina.

Quanto à detecção de *T. gondii* nos tecidos dos animais sobreviventes após a infecção com a cepa virulenta RH ou avirulenta ME49 de *T. gondii* e tratamento com o extrato total de *A. annua* ou sulfadiazina, uma comparação dos resultados obtidos pela imunohistoquímica, bioensaio em camundongos e PCR foi realizada. Os resultados mostraram que nem a administração da droga usual nem do extrato da planta foram capazes de eliminar completamente o parasitismo tecidual. Esses achados foram particularmente evidenciados pelo bioensaio e PCR que demonstraram a presença de parasitos viáveis ou antígenos parasitários ou ainda DNA de *T. gondii* nos tecidos dos animais sobreviventes. Resultados similares foram encontrados em um estudo avaliando a utilização de uma droga potencial no tratamento da infecção aguda pela cepa RH de *T. gondii*, mostrando que a combinação de atovaquone e clindamicina teve um efeito protetor em camundongos, mas os animais sobreviventes apresentaram parasitos pelo bioensaio e PCR (DJURKOVIC-DJAKOVIC et al., 1999) Dessa forma, assim como a sulfadiazina, o extrato total de *A. annua* parece não ter efeito sobre as formas císticas do parasito. Entretanto, investigações adicionais avaliando diferentes doses e vias de administração devem ser realizadas para que esta hipótese seja esclarecida. Em um estudo avaliando o efeito de derivados de artemisinina sobre a infecção crônica de *T. gondii* em camundongos, foi observada uma possível recrudescência do parasito e que tal fato poderia limitar o uso dessas drogas no tratamento de encefalite toxoplásmica (SARCIRON et al., 2000).

### **5.3 Estimulação e secreção de citocinas e nitrito por macrófagos murinos na presença do extrato total de *A. annua***

Na tentativa de elucidar um provável efeito imunomodulatório do extrato total de *A. annua*, macrófagos peritoneais murinos foram estimulados com diferentes concentrações do extrato da planta e os sobrenadantes de cultura foram avaliados em relação à produção de citocinas e nitrito. Foi observado que, o extrato total de *A. annua* foi capaz de induzir níveis significantes de IL-12, de modo dose-dependente. Por outro lado, não foram detectados níveis significantes de TNF- $\alpha$  e nitrito nos sobrenadantes de cultura, sugerindo que o extrato de *A. annua* parece utilizar mecanismos independentes de intermediários reativos de nitrogênio para o controle da infecção aguda por *T. gondii*. Alternativamente, níveis de TNF- $\alpha$  não foram detectados por estarem abaixo dos limites de detecção do ensaio empregado (390 pg/ml).

Estudos recentes têm demonstrado efeitos supressores de artemisinina e seus derivados. Zhou e colaboradores (2005) avaliaram a função de um derivado de artemisinina (SM735) sobre a proliferação de células do baço murinas e na produção de citocinas, demonstrando que SM735 inibiu fortemente a proliferação celular e a produção de citocinas características do perfil pró-inflamatório, incluindo IL-12, IL-6 e IFN- $\gamma$ , mas não de IL-2. Wang e colaboradores (2007) verificaram que um outro derivado de artemisinina (SM905) apresentou alta atividade inibitória da proliferação de células do baço e da reação linfocitária mista, bem como da produção de IL-2 e IFN- $\gamma$ , por meio de inibição da fosforilação da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). Apesar desses derivados de artemisinina apresentarem potente atividade imunossupressora *in vitro* e *in vivo*, nossos resultados utilizando o extrato total de *A. annua* e não unicamente o seu mais conhecido metabólito ativo (artemisinina),

mostraram um efeito mais estimulatório que inibitório enfatizado pela alta produção de IL-12.

É de conhecimento geral que o extrato total de *A. annua* contém metabólitos secundários além do metabólito ativo artemisinina (ELFORD et al., 1999; BHAKUNI et al., 2001; BILIA et al., 2006). Estudos recentes têm enfatizado que a artemisinina não é o único componente ativo em *A. annua* e que a efetividade da administração da infusão da planta no controle da malária pode ser devido a outros metabólitos presentes no extrato. Isto foi confirmado em experimentos *in vivo* mostrando que camundongos tratados com a infusão de *A. annua* apresentaram uma redução de 50% da parasitemia quando comparado com o tratamento de artemisinina pura que não mostrou efeito diferente do placebo (WILLCOX et al., 2007). Acredita-se que a ação antimalária da infusão é devido ao efeito sinérgico da combinação de artemisinina com polimetoxiflavonas, tais como a casticin, chrysosplenetin, chrysosplenol-D e circilineol, promovendo uma total atividade anti-*Plasmodium* (BHAKUNI et al., 2001). A presença de outros compostos ativos sugere que o extrato de *A. annua* é uma terapia natural combinada de artemisinina. Portanto, nós acreditamos que o extrato total de *A. annua* pode exercer uma função imunomodulatória sob o efeito imunossupressor do princípio ativo artemisinina e seus derivados sintéticos, dessa forma, contribuindo para controlar a infecção por *T. gondii*.

Finalmente, nossos resultados indicam potencial utilização do extrato total de *A. annua* no controle da infecção por *T. gondii*, devido a sua baixa toxicidade e efeito inibitório diretamente contra o parasito, resultando em um excelente índice terapêutico.

## 6. CONCLUSÕES

A toxicidade do extrato total de *A. annua* em fibroblastos humanos foi relativamente baixa enquanto a toxicidade da sulfadiazina como medicamento convencional para o controle da infecção por *T. gondii* foi relativamente alta.

O extrato total de *A. annua* foi capaz de controlar parcialmente a infecção por *T. gondii* em experimentos *in vitro*, sendo que este efeito foi mais fortemente observado no pré-tratamento dos parasitos antes da infecção celular.

O Índice Terapêutico (IT) em condições de pré-tratamento dos parasitos com o extrato total de *A. annua* antes da infecção celular foi melhor que o IT observado para a sulfadiazina, evidenciando um efeito inibitório direto sobre o parasito.

O IT para o tratamento com extrato total de *A. annua* em células previamente infectadas por *T. gondii* foi similar ao IT da sulfadiazina, porém ambos relativamente baixos em comparação ao IT da condição de pré-tratamento dos parasitos.

A infecção aguda com a cepa virulenta (RH) de *T. gondii* em camundongos C57BL/6 foi parcialmente controlada pela administração via subcutânea do extrato total de *A. annua* bem como pela administração de sulfadiazina.

A infecção aguda com a cepa avirulenta (ME49) de *T. gondii* foi completamente controlada pela administração via subcutânea do extrato total de *A. annua* bem como pela administração de sulfadiazina, uma vez que taxas de mortalidade não foram

observadas. Entretanto, em ambas condições as drogas não foram capazes de eliminar o parasitismo tecidual.

O tratamento com o extrato total de *A. annua* na infecção com a cepa virulenta de *T. gondii* promove uma atenuação dos sintomas clínicos que são observados por um período mais curto de tempo. O oposto foi verificado para infecção com a cepa avirulenta.

O extrato total de *A. annua* possui um efeito predominantemente estimulatório nas condições analisadas, enfatizado pela maior produção de IL-12 por macrófagos peritoneais murinos. Assim, o extrato da planta pode exercer uma função imunomodulatória contribuindo para controlar a infecção por *T. gondii*.

## REFERÊNCIAS

ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews**, London, v. 5, n. 2, p. 162-170, Fev. 2005.

BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A. O.; COSTA, I. N.; PENA, J. D. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Susceptibility to Vertical Transmission of *Toxoplasma gondii* is Temporally Dependent on the Preconceptional Infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, Londres, v. 28, p.624-630 Dec. 2007.

BARRAGAN, A.; BROSSIER, F.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. **Cell Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 651-568, Apri. 2005.

BARTLEY, P. M.; WRIGHT, J.; SALES, J.; CHIANINI, F.; BUXTON, D.; INNES, E. A. Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* *in vivo*. **Parasitology**, New York, v. 133,n. 4, p. 421-12, Oct. 2006.

BHAKUNI, R. S.; JAIN, D. C.; SHARMA, R. P.; Kumar, S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. **Current Science**, Bangalore, v. 80, n. 1, p. 35-48, Jan. 2001.

BHOPALE, G. M. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status **Microbes Infection**, Paris, v. 5, n. 5, p. 457-452, Apr. 2003.

BILIA, A. R.; MELILLO DE MALGALHAES, P.; BERGONZI, M. C.; VINCIERI, F. F.. Simultaneous analysis of artemisinin and flavonoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and a selected cultivar. **Phytomedicine**, New York v.13, n.1 p. 487-93, Feb. 2006.

BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, London v. 64, n. 3, p. 607-623, Sept. 2000.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E.. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion Microbiollogy**. London , v. 5, n. 4, p. 438-442, Aug. 2002.

BUXTON, D.;INNES, E. A. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. **Parasitology**, London, v. 110, p. 11-16, 1995.

CAMARGO, M. E.; SILVA, S. M.; LESER, P. G.; GRANATO, C. H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 213-218, Sep. 1991.

CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; MINEO, J. R.; TAKIGUTI, C. K.; NAKAHARA, O. S. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 21, n. 1, p. 55-58, 1978.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 12, p. 117-118, Jun. 1964.

CARRUNTERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, Baltimore, v. 81, n. 2, p. 111-122, Feb. 2002.

CHEMLA, C.; VILLENA, I.; AUBERT, D.; HORNOY, P.; DUPOUY, D.; LEROUX, B.; BORY, J. P.; PINON, J. M. Preconception seroconversion and maternal seronegativity at delivery do not rule out the risk of congenital toxoplasmosis. **Clinical Diagnostic Lab Immunology**, v. 9, n. 2, p. 489-490, Mar. 2002.

CLEARY, M. D.; SINGH, U.; BLADER, I. J.; BREWER, J. L.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 1, n. 3, p. 329-340, June. 2002.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Princípios éticos na experimentação animal**. 1991. Disponível em: <http://www.univap.br>. Acesso em: 10 maio 2005.

COPPIN, A.; DZIERSZINSKI, F.; LEAGRAND, S.; MORTUAIRE, M.; FERGUSON, D.; TOMAVO, S. Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage of polysaccharide during differentiation and tissue cysts formation in *Toxoplasma gondii*. **Biochemistry**, Paris, v. 85, n 2, p. 353-361, Apri. 2003.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v. 11, n. 4, p. 569-588, Oct. 1998.

DHINGRA, V.; VISHWESHWAR RAO, K.; LAKSHMI NARASU, M. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. **Basic Life Science**, New York, v. 66, n. 4, p. 279-300, 2000.

DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; NIKOLIC', T.; GANGNEUX, F. R.; BOBIC, B.; NIKOLIC, A. Synergistic Effect of Clindamycin and Atovaquone in Acute Murine Toxoplasmosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 43, n. 9, p. 2240-2244, Sept. 1999.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Plantas**, v. 14, p. 11-33, Set 2005.

DUBEY, J. P.; GOMEZ-MARÍN, J. E.; BEDOYA, A.; LORA, F.; VIANNA, M. C.; HILL, D.; KWOK, O. C.; SHEN, S. K.; MARCET, P. L.; LEHMANN, T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 134, n. 1-2, p. 67-72, Nov, 2005.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, Dec, 2004.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; da SILVA, D. S.; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 89, n. 4, p. 851-853, 2003a.

DUBEY, J. P.; NAVARRO, I. T.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; FREIRE, R. L.; PRUDÊNCIO, L. B.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M.; LEHMANN, T. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Parana, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, n. 3, p. 229-234, Nov, 2003b.

DUBEY, J. P.; VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L.; PISCOPO, M.; GRAHAM, D. H.; DAHL, E.; SREEKUMAR, C.; VIANNA, M. C.; LEHMANN, T. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from Argentina. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 89, n. 5, p. 1063-1064, Dec, 2003c.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; BLACKSTON, C. R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S. M.; RAGOZO, A. M.; NISHI, S. M.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C.; HILL, D. E.; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 99-105, 2002.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v.11, n. 2, p. 267-299, Apr. 1998.

DUNAY, I.R.; HEIMESAAT, M. M.; BUSHRAB, F. N.; MÜLLER, R. H.; STOCKER, H.; ARASTEH, K.; FITZNER, M. K. R.; BORNER, K.; LIESENFELD, O. Atovaquone Maintenance Therapy Prevents Reactivation of Toxoplasmic Encephalitis in a Murine Model of Reactivated Toxoplasmosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington v.43, n. 9, p. 4848–4854, Dec. 2004.

DZIERSZINSKI, F.; MORTUAIRE, M.; CESBRON-DELAUW, M.F.; TOMAVO, S. Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 574-582, Aug. 2000.

ELFORD, B. C. ; ROBERTS, M. F.; PHILLIPSON, J. D.; WILSON, R. J. Potentiation of the antimalarial activity of qinghaosu by methoxylated flavones **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 3, p. 434-436, 1987.

FERREIRA, R.A.; OLIVEIRA, A.B.; RIBEIRO, M.F.; TAFURI, W. L.; VITOR, R. W. *Toxoplasma gondii*: in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1,4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine. **Experimental Parasitology**, New York , v. 113, n. 2, p. 125-129, Jun. 2006.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, Roma, v. 40, n. 1, p. 71-80, 2004.

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W.; WAGNER, E. H. *Clinical Epidemiology: The essentials*. Ed. Baltimore: Willians and Wilkins 1996.

FOUDRINIER, F.; VILLENA, I.; JAUSSAUD, R.; AUBERT, D.; CHEMLA, C.; MARTINOT, F.; PINON, J. M. Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 41, n. 4, p. 1681-1686, Apr. 2003.

FREYRE, A.; FALCO'N, J.; ME'NDEZ, J.; RODRIGUEZ, A.; CORREA, L.; GONZALEZ, M. *Toxoplasma gondii*: partial cross-protection among several strains of the parasite against congenital transmission in a rat model. **Experimental Parasitology**, New York, v.112, n.1, p. 8-12, 20006.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHEEVER, A.; KUHN, R.; MULLER, W.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 157, n. 2, p. 798-805, 1996.

GRIGG, M. E.; BOOTHROYD, J. C. Rapid identification of virulent type 1 strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington , v. 39, n. 1, p. 398-400, Jan. 2001.

HE, X. L.; GRIGG, M. E.; BOOTHROYD, J. C.; GARCIA, K. C. Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. **Nature Structural Biology**, New York, v. 9, n. 8, p. 606-611, Aug. 2002.

HEEMSKERK, W.; SCHALLIG, H.; PITERS, B. P. The world of artemisia in 44 questions **The Royal Tropical Institute** Mar. 2006.

HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical and Experimental Medicine**, Verlag, v. 3, n. 2, p. 84-105, Jun. 2003.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 8, n. 10, p. 634-640, 2002.

HOLFELS, E.; MCAULEY, J.; MACK, D.; MILHOUS, W.K.; MCLEOD, R. In vitro effects of artemisinin ether, cycloguanil hydrochloride (alone and in combination with

sulfadiazine), quinine sulfate, mefloquine, primaquine phosphate, trifluoperazine hydrochloride, and verapamil on *Toxoplasma gondii*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 38, n.6, p. 1392-6, Jun. 1994.

HU, K.; JOHNSON, J.; FLORENS, L.; FRAUNHOLZ, M.; SURAVAJJALA, S.; DILULLO, C.; YATES, J.; ROOS, D. S.; MURRAY, J. M. Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 2, n 2, Feb. 2006.

JACQUET, A.; COULON, L.; De NEVE, J.; DAMINET, V.; HAUMONT, M.; GARCIA, L.; BOLLEN, A.; JURADO, M.; BIEMANS, R. The surface antigens SAG3 mediates the attachment of *Toxoplasma gondii* to cell-surface proteoglycans. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 116, n. 1, p. 35-44, Aug. 2001.

JONES-BRANDO, L.; D'ANGELO, J.; POSNER, G. H.; YOLKEN, R. In vitro inhibition of *Toxoplasma gondii* by four new derivatives of artemisinin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 50, n.12, p. 4206-8, Dec. 2006.

JUNG, C.; LEE, C.Y.F.; GRIGG, M.E. The SRS superfamily of *Toxoplasma gondii* surface proteins. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 285-296, Marc. 2004.

KASPER, L.H.; MINEO, J.R. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 10, n. 5, p. 184-188, May. 1994.

KEISER, J.; MORSON, G. *Faciola hepatica*: Tegumental alterations in adult flukes following in vitro and in vivo administration of artesunate and artemether. **Experimental parasitology**, New York, v. 22, Ago. 2007a.

KEISER, J.; UTZINGER, J.; VENNERSTRON, J. L.; DONG, Y.; BRENNAN, G.; FAIRWEATHER, I. Activity of artemether and OZ78 against triclabendazole-resistant *Faciola hepatica*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 28, Set. 2007b.

KEISER, J.; SHU-HUAN, X.; JIAN, X.; ZHEN- SAN, C.; ODERMATT, P.; TESANA, S.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Effect of artesunate and artemether against *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini* in rodent models. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 28, n. 4, p. 370-373, Out. 2006.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 34, n. 3, p. 423-432, 2004.

KRAVETZ, J. D.; FEDERMAN, D. G. Toxoplasmosis in pregnancy. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 118, n. 3, p. 212-216, 2005.

LANS, C.; TURNER, N.; KHAN, T.; BRAUER, G. Ethnoveterinary medicines used to treat endoparasites and stomach problems in pigs and pets in British Columbia, Canada **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. .148, n. 3-4, p. 325-340, Set. 2007.

LEKUTIS, C.; FERGUSON, D.J.; BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. **Experimental Parasitology**, New York, v. 96, n. 2, p. 89-96, Oct. 2000.

LOURENÇO, E. V.; PEREIRA, S. R.; FAÇA, V. M.; COELHO-CASTELO, A. A.; MINEO, J. R.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; GREENE, L. J.; PANUNTO-CASTELO, A. *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. **Glycobiology**. Oxford, v.11, n. 7, p. 541-547, Jul. 2001.

LUFT, B. J.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clin Infect Dis.**, Chicago, v. 15, n° 2, p. 211-222, Aug. 1992.

LYONS, R. E.; MCLEOD, R.; ROBERTS, C. W.. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 198-201, May. 2002

MANGER, I. D.; HEHL, A. B.; BOOTHROYD, J. C. The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol- anchored antigens related to SAG1. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 5, p. 2237-2244, May. 1998.

MARTINS-DUARTE, E. S.; URBINA, J. A.; SOUZA, W.; VOMMARO, R. C. Antiproliferative activities of two novel quinuclidine inhibitors against *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Washington, v. 58, n.1, p. 59-65, Jul. 2006.

MESHNICK, S. R.; TAYLOR, T. E.; KAMCHONWONGPAISAN, S. Artemisinin and the Antimalarial Endoperoxides: from Herbal Remedy to Targeted Chemotherapy. **Microbiological Reviews** Washington, v. 60, n. 2, p. 301-315, Jun. 1996.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 27, n. 2, p. 283-287, fev. 1980.

MINEO, J. R.; McLEOD, R.; MACK, D.; SMITH, J.; KHAN, I. A.; ELY, K. H.; KASPER, L. H. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 150, n. 9, p. 3951-3964, May. 1993.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, London, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, Jun. 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOSHKANI, S. K.; DALIMI, A. Evaluation of the Efficacy of Atovaquone Alone or in Combination with Azithromycin against Acute Murine Toxoplasmosis. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 24, p. 169-177, Sep. 2000.

MUELLER, M.S.; RUNYAMBO, N.; WAGNER, I.; BORRMANN, S.; DIETZ, K.; HEIDE, L. Randomized controlled trial of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annual Wormwood) in the treatment of malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 98, n. 5, p. 318-321, May. 2004.

NAGAMUNE, K.; BEATTY, W. L.; SIBLEY, L. D. Artemisinin induces calcium-dependent protein secretion in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Eukaryot Cell**. Washington, disponível em: <http://www.pubmed.br>. Acesso em: 08 de outubro de 2007.

NAGAMUNE, K.; MORENO, S. N.; SIBLEY, L. D; Artemisinin resistant mutants of *Toxoplasma gondii* have altered calcium homeostasis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, disponível em: <http://www.pubmed.br>. Acesso em: 08 de outubro de 2007..

NAGEL, S. D.; BOOTHROYD, J. C. The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, n. 10, p. 5569-5574, Apr. 1989.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2002, 428 p.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondi. **C. R. Hebd Séances Academy Sciences**, v. 147, p. 763-766, 1908.

OLIVEIRA, J. G.; SILVA, N. M.; SANTOS, A. A.; SOUZA, M. A.; FERREIRA, G. L.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. BeWo trophoblasts are unable to control replication of *Toxoplasma gondii*, even in the presence of exogenous IFN-gamma. **Placenta**, London, v. 27, n. 6, p. 691-8, Jun. 2006.

OU-YANG, K.; KRUG, E. C.; MARR, J. J.; BERENS, R. L. Inhibition of growth of *Toxoplasma gondii* by Qinghaosu and derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** Washington, v. 34, n. 10, p. 1961-1965, Oct. 1990.

PENA, H. F.; SOARES, R. M.; AMAKU, M.; DUBEY, J. P.; GENNARI, S. M. *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Research in Veterinary Science**, London, v. 81, n. 1, p. 58-67, Aug. 2006.

PARMLEY, S. F.; SGARLATO, G. D.; REMINGTON, J. S. Genomic and corrected cDNA sequence of the P28 gene from *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 57, n. 1, p. 161-165, 1993.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal Neonatal Medicine**. Amsterdam, v.12, n. 3, p. 214-223, Jun. 2007.

RATH, K.; TAXIS, K.; WALZ, G.; GLEITER, C. H.; LI, S-M.; HEID, L. Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annuam wormwood). **American journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimor v. 70,n.2 128-132, Jan. 2004.

REMINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 42, n. 3, p. 941-945, Mar. 2004.

REMINGTON, J. S.; McLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J. S.; Klein, J. (Eds.), **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 5 ed., Philadelphia: W B Saunders, pp. 205-346, 2001

REMINGTON, J.S.; MCLEOD, R.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J. S.; Klein, O. **J Infec Dis Fet Newb Inf**. v. 140. 1995.

REY, L. Parasitologia. 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan S.A.; 2001. 856p.

SABIN, A.; FELDMAN, H. A. Dyes as microchemical indicators of anil immunity phenomenon affecting a protozoan parasitic (*Toxoplasma*). **Science**, Washington DC, v. 108, p. 660-663, 1948.

SAEIJ, J. P. J.; BOYLE, J. P.; BOOTHROYD, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 10, p. 476-481, Oct. 2005.

SARCIRON, M. E.; SACCHARIN, C.; PETAVY, A. F.; PEYRON, F. Effects of artesunate, dihydroartemisinin, and an artesunate-dihydroartemisinin combination against *Toxoplasma gondii*. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimor v. 62, n.1, p. 73-76, Jan. 2000.

SEABRA, S. H.; SOUZA, W.; DAMATA, R. *Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages. **Experimental Parasitology**, New York, v. 100, n. 5 62-70. Jan. 2002.

SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 12, n. 6, p. 504-512, Jun. 2006.

SILVA, N. M.; TAFURI, W. L.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; MINEO, J. R.; GAZZINELLI, R. T. *Toxoplasma gondii*: in vivo expression of BAG-5 and cyst formation is independent of TNF p55 receptor and inducible nitric oxide synthase functions. **Microbes and Infection**, Paris, v. 4, n.3, p. 261-270, Marc. 2002.

SPLENDRE, A. Un nuovo protozoa parassita dei conigli. Incontrato nelle lesioni Anatomiche d'una malattia che Ricorda in molti punti il kala-azar dell'uomo. **Revista da Sociedade de Ciências de São Paulo**, São Paulo, v. 3, p. 109-112, 1908

STOKKERMANS, T.J.; SCHWARTZMAN, J.D.; KEENAN, K.; MORRISSETTE, N. S.; TILNEY, L.,G.; ROOS, D. S. Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. **Experimental Parasitology**, New York, v.84, n. 3, p. 355-70, Dec. 1996.

SWITAJ, K.; MASTER, A.; SKRZYPCZAK, M.; ZABOROWSKI, P. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 11, n. 3, p. 170-176, Mar. 2005.

SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 137-142, Mar. 2006.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, Apr. 2000.

TOMAVO, S.; DUBREMETZ, J.F.; SCHWARZ, R.T. A family of glycolipids from *Toxoplasma gondii*: identification of candidate glycolipid precursor(s) for *Toxoplasma gondii* glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore (MD), v. 267, n. 17, p. 11721-11728, Jun. 1992.

TOMAVO, S.; FORTIER, B.; SOET, M.; ANSEL, C.; CAMUS, D.; DUBREMETZ, J. F. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection Immunity**, Washington, v. 59, n.10 , p. 3750-3753, Oct. 1991.

TOMAVO, S.; SCHWARZ, R.T.; DUBREMETZ, J.F. Evidence for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii*. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 20, n. 296 (Suppl.), 1989.

UTZINGER, J.; XIAO, SH.; TANNER, M.; KEISER, J. Artemisinins for schistosomiasis and beyond. **Current Opinion Investigation Drugs**, v. 8, n. 2, p. 105-116, Fev. 2007.

WANG, J. X.; TANG, W.; YANG, Z. S.; WAN, J.; SHI, L. P.; ZHANG, Y.; ZHOU, R.; NI, J.; HOU, L.F.; ZHOU, Y.; HE, P. L.; YANG, I. F.; LI, Y.; ZUO, J. P. Suppressive effect of a novel water-soluble artemisinin derivative SM905 on T cell activation and proliferation in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 564, p. 211–218, Feb. 2007.

WILLCOX, M.; FALQUET, J.; FERREIRA, J. F. S.; GILBERT, B.; HSU, E.; MELILLO de MAGALHÃES, P.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J.; SHARMA, V. P.; WRIGHT, C.W.; YAODE, W. *Artemisia annua* as a herbal tea for malaria. **The African Journal Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, n. 1, p. 121-123, 2007.

XIAO, S. H.; KEISER, J.; CHOLLET, J.; UTZINGER, J.; DONG, Y.; ENDRIES, Y.; VENNERSTROM, J.L.; TANNER, M. In vitro and in vivo activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** Washington, v. 51, n. 4, p. 1440-1445, Fev. 2007.

ZHOU, W. L.; WU, J. M.; WU, Q. L.; WANG, J. X.; ZHOU, Y.; ZHOU, R.; HE, P. L.; LI, X. Y.; YANG, Y. F.; ZHANG, Y.; LI, Y., ZUO, J. P. A novel artemisinin derivative, 3-(12-beta-artemisininoxy) phenoxy succinic acid (SM735), mediates immunosuppressive effects in vitro and in vivo. **Acta Pharmacologica Sinica**, Beijing, v. 26, n. 11, p. 1352–1358, Nov. 2005.

