

AÇÃO DE COMPOSTOS DERIVADOS DE NAFTOQUINONA NO
DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE *Toxoplasma gondii*

LUCIANA LEMOS RANGEL DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL NORTE FLUMINENSE- UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
MAIO - 2013

AÇÃO DE COMPOSTOS DERIVADOS DE NAFTOQUINONA NO
DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE *Toxoplasma gondii*

LUCIANA LEMOS RANGEL DA SILVA

Orientador: Dr. Renato Augusto DaMatta

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual do Centro de Biociências e Biotecnologia (LBCT/CBB)-UENF, com financiamento CAPES, CNPq, FAPERJ e UENF.

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

MAIO – 2013

AÇÃO DE COMPOSTOS DERIVADOS DE NAFTOQUINONA NO
DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE *Toxoplasma gondii*

LUCIANA LEMOS RANGEL DA SILVA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 21 de maio de 2013.

Comissão examinadora:

Prof.Dr^a Ana Carolina Stumbo Machado –IBRAG/DHE/UERJ

Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha–LBCT/CBB/UENF

Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro –LBR/CBB/UENF

Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta- LBCT/CBB/UENF
(Orientador)

*“Quereis que vos ensineis o modo de chegar à ciência verdadeira?
Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe,
saber que não se sabe; na verdade é este o saber.”*

Confúcio

*Dedico essa dissertação aos meus pais,
Lúcia e Rodolfo,
à minha irmã Mariana,
e ao meu amado João.*

Agradecimentos

Ao meu amado Deus, fonte esperança e fé, que permitiu ultrapassar muitas barreiras, quando estas pareciam impossíveis de transpor.

Ao meu querido orientador, Renato Augusto DaMatta, pela paciência em me guiar pelos caminhos da ciência, mesmo quando minha teimosia o tira do sério.

Aos amigos de bancada sempre solícitos em ajudar, Fernanda de Souza, Gabriel Rabello, João de Sá, Thiago Torres, Thiago Alves, Juliana Huziwara, Julianna Santos, Juliana Padrão, Laura Motta, Farlen Miranda.

Aos queridos Fernanda de Souza, João de Sá e Gabriel Rabello pelo entrosamento, muito profissional, durante as reuniões de discussão de artigo em estabelecimento de comercialização de bebida alcoólica.

Ao Marlon Heggdorne pela ajuda imprescindível em me ensinar o cálculo de IC₅₀ e pelo trato carinhoso de meus resultados durante o processo de plotagem de dados no Graphpad Prism®.

À querida Juliana Huziwara por emprestar seus pais por uma semana e aos queridos Luiz e Vera Azevedo pela estada maravilhosa em sua casa.

À Juliana Portes pelo auxílio na passagem de informações e dicas sobre os compostos testados, e por sua visita, mesmo que rápida, para ajudar em alguns experimentos.

Ao Thiago Alves por muitas vezes funcionar como meu serviço de correios, mesmo que não muito rápido, na entrega de compostos e até mesmo de meu esquecido caderno de protocolo deixado na UEZO.

Ao Sérgio Henrique Seabra e sua amável esposa Nathália Seabra, pela estada durante o período no qual trabalhei na UEZO e, em particular, ao Sérgio pela ajuda na captura das imagens de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura na UEZO.

Ao Dr. Chaquip Netto do Laboratório de Química Bioorgânica (LQB) da UFRJ por produzir e ceder seus promissores compostos.

Às técnicas Darly Gravitol e Adriana Martins pelo preparo e alíquotas de material e reagente de cultura de células.

À querida Beatriz Ribeiro, à Márcia Adriana da Silva e à Giovana de Moraes, técnicas do preparo de amostras, cujo trabalho foi imprescindível à realização dos protocolos de preparação de amostras para as microscopias eletrônicas.

Aos meus amados pais, por acreditarem em mim e me apoiarem acima de tudo.

À minha irmã, Mariana Lemos, por ser minha amiga e por estar sempre presente mesmo que seja para atrapalhar ao invés de ajudar. Obrigada por me fazer rir quando a vontade é chorar.

Ao meu amado, João Pessoa, pela sua extrema compreensão, pelos seus conselhos e por sua paciência.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE ESQUEMAS E FIGURAS.....	X
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura.....	1
2.1. Ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i>	1
2.2. Comparação ultraestrutural de taquizoítas e bradizoítas	4
2.3. Entrada e estabelecimento do parasito na célula hospedeira.....	5
2.4. Linhagens clonais de cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	7
2.5. Manipulação dos mecanismos microbicidas efetores por <i>Toxoplasma gondii</i> pelas cepas virulentas e avirulentas.....	8
2.6. Fatores determinantes na conversão de taquizoíta a bradizoíta.....	10
2.7. Espécies reativas de oxigênio.....	11
2.8. Toxoplasmose.....	14
2.9. Tratamento quimioterápico.....	15
2.10. Naftoquinonas	16
2.11. Pterocarpanos.....	17
2.12. Derivado de naftoquinonas	17
2.13. Pterocarpanoquinonas	18
3. Justificativa	19
4. Objetivos.....	20
4.1. Objetivo geral	20
4.2. Objetivos específicos	20
5. Matéria l e Métodos.....	20
5.1. Cultivo de células da linhagem LLC-MK2	20
5.2. Obtenção de <i>T. gondii</i>	20
5.3. Derivado de naftoquinona	20
5.4. Testes de viabilidade celular	21
5.5. Interação <i>Toxoplasma gondii</i> com células LLC-MK2 e tratamento com compostos derivados de naftoquinona.....	22
5.6. Preparo de células para avaliação da carga parasitária.	23

5.7. Detecção de glicoproteínas da parede cística de <i>Toxoplasma gondii</i> pela lectina de <i>Dolichus biflorus</i>	23
5.8. Microscopia eletrônica de transmissão	24
5.9. Detecção de grânulos de amilopectina por Thierry	24
6. Resultados.....	24
7. Discussão	33
8. Conclusão.....	37
9. Bibliografia	37

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT: catalase

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

GRA: Proteínas relacionadas a grânulos densos

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IC₅₀: concentração que inibe a metade do crescimento

IFN- γ : Interferon gamma

IL-12: Interleucina 12

IRGs: GTPases reguladas por IFN- γ

LDH: Lactato desidrogenase

LLC-MK2: epitelial de rim de macaco *Rhesus*

MTT: Bromo 3-(4,5-Dimetil tiazol-2-il)-(2,5-difenil tetrazolio)

MVP: Membrana do vacúolo parasitóforo

O₂: oxigênio molecular

O₂⁻: ânion superóxido

ROP: Proteínas do bulbo da róptria

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SFB: soro fetal bovino

SOD: superóxido dismutase

STAT: Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription*

LISTA DE ESQUEMAS E FIGURAS

Esquema 1. Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> (Modificado de FERGUSON, 2002).....	3
Esquema 2. Comparação ultraestrutural entre os estágios taquizoíta e bradizoíta de <i>Toxoplasma gondii</i> (modificado de DUBEY et al., 1998).....	5
Esquema 3. Geração de espécies reativas de oxigênio- ciclo redox.....	12
Esquema 4. Ciclo redox induzido por quinonas (retirado de DA SILVA et al., 2002).....	14
Esquema 5. Fórmula molecular, fórmula química e peso molecular das pterocarpanoquinonas testadas nesse trabalho, LQB94 sintetizada por Da Silva et al. (2009) e LQB150 e LQB151 sintetizadas por Netto et al. (2010).	19
Figura 1. Imagem de células LLC-MK2 tratadas ou não com LQB94, LQB150 ou LQB151 na concentração de 20 µM por 48 horas marcadas com brometo de etídio para análise de viabilidade celular	25
Figura 2. Cinética de tratamento dos compostos LQB94, LQB150 e LQB151 comparado com os controles não tratados em células LLC-MK2 infectadas com <i>Toxoplasma gondii</i> por 24 e 48 horas. * Significativo com relação ao controle 24 horas	26
Figura 3. Porcentagem de inibição de crescimento de <i>Toxoplasma gondii</i> em células LLC-MK2 tratadas com LQB94, LQB150 ou LQB151 por 24 horas.	27
Figura 4. Porcentagem de inibição de crescimento de <i>Toxoplasma gondii</i> em células LLC-MK2 tratadas com LQB94, LQB150 ou LQB151 por 48 horas	27
Figura 5. Imagens de células LLC-MK2 infectadas com <i>Toxoplasma gondii</i> , tratadas ou não com LQB94, LQB150 ou LQB151 no período de 48 horas, coradas com Giemsa.....	28
Figura 6. Imagens de microscopia de fluorescência e de contraste interferencial (DIC) de células LLCMK2 infectada com taquizoítas de <i>Toxoplasma gondii</i> tratadas por 48 horas ou não com compostos (10 µM), marcados com <i>Dolichos biflorus</i> (DBA) que reconhece parede de cistos do parasito; DAPI (DAPI), que reconhece DNA; e anticorpo anti- <i>T. gondii</i> (Anti-Tg)	29
Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células LLC-MK2 infectadas com <i>Toxoplasma gondii</i> tratadas ou não com os compostos na concentração de 10 µM por 48 horas.....	31

Figura 8. Análise da viabilidade celular pela formação de formazan em células encubadas com MTT, tratadas com LQB151 em distintas concentrações por 24 horas.....	32
Figura 9. Análise da viabilidade celular pela detecção de liberação de LDH do sobrenadante de células tratadas com LQB151 em distintas concentrações por 24 horas	33

RESUMO

A toxoplasmose é uma doença causada por *Toxoplasma gondii* e pode causar comprometimento do sistema nervoso central. Os tratamentos convencionais geram diversos efeitos colaterais nos pacientes, como supressão de células na medula óssea, erupções cutâneas e implicações gastrointestinais. Por isso, é necessária a procura por novos compostos com ação contra *T. gondii* com menor efeito colateral. Os compostos derivados de naftoquinona demonstram ação antiproliferativa contra células de câncer mamário humano resistente a múltiplas drogas, *Leishmania amazonensis* e *Plasmodium falciparum*. Como esses compostos atuam aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio que inibem o crescimento do *T. gondii* é possível que funcionem no controle desse protozoário. O objetivo desse trabalho foi verificar se LQB94, LQB150 ou LQB151, compostos derivados de naftoquinonas, interferem no desenvolvimento *in vitro* de *T. gondii*. Para isto, células da linhagem LLC-MK2 foram cultivadas na presença dos compostos em diferentes concentrações e a viabilidade celular avaliada. Para avaliação do desenvolvimento do parasito as células foram infectadas, tratadas com os compostos em diferentes concentrações e o crescimento de *T. gondii* avaliado por microscopia óptica. A conversão de taquizoítas a bradizoítas foi analisada pela marcação com a lectina de *Dolichus biflorus* conjugada a FITC e pela ultraestrutural do parasito em células hospedeiras tratadas com os compostos. Os compostos mostraram baixa toxicidade às células hospedeiras e diminuíram significativamente suas cargas parasitárias. A LQB151 mostrou inibição do desenvolvimento do parasito após 24 e 48 horas utilizando 2,5 µM. Todos os compostos foram capazes de converter taquizoítas a bradizoítas e induziram alterações ultraestruturais em suas membranas plasmáticas. Esses resultados demonstraram que os compostos derivados de naftoquinonas são potenciais quimioterápicos para tratamento de toxoplasmose justificando experimentos *in vivo* em camundondos infectados.

Palavras-chave: Toxoplasmose, tratamento quimioterápico, derivado de naftoquinona.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a disease caused by *Toxoplasma gondii* and it may cause impairment of the central nervous system. Conventional treatments produce side effects in many patients, such as suppression of bone marrow, skin rashes and Gastrointestinal implications. Therefore, there is a demand for new compounds with antiparasitic action against *T. gondii* with less collateral damage. Compounds derived from naphthoquinone demonstrated antiproliferative action against human breast cancer cells resistant to multiple drugs, *Plasmodium falciparum* and *Leishmania amazonensis*. Because these compounds act by enhancing the production of reactive oxygen species, that is a possibility that inhibit the growth of *T. gondii*. The aim of this work was to verify if LQB94, LQB150 or LQB151, derivatives from naphthoquinones, interfere with the *in vitro* development of *T. gondii*. For this, the cell line LLC-MK2 was cultured in the presence of the compounds at different concentrations and cell viability was assessed. For the evaluation of parasite development, infected cells were treated with compounds at different concentrations and parasite growth was evaluated by optical microscopy. The conversion of tachyzoite to bradyzoite was evaluated by labelling cells with *Dolichus biflorus* lectin conjugated to FITC and by ultrastructural analysis of the parasite in the host cells treated with the compounds. The compounds showed low toxicity to host cells and decreased significantly their parasitic loads. The LQB151 showed inhibition of parasite development at 24 and 48 hours with 2.5 μ M. All compounds were able to convert to tachyzoites and bradyzoites and to induce ultrastructural changes in their plasma membranes. These results demonstrated that compounds derived from naphthoquinones are potential chemotherapeutic agents for the treatment of toxoplasmosis and justify experiments *in vivo* in infected mice.

Keywords: Toxoplasmosis, chemotherapy, naphthoquinone derivative.

1. Introdução

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito pertencente ao filo Apicomplexa capaz de infectar animais endotérmicos, incluindo seres humanos e animais de importância econômica (TENTER et al., 2000). Acredita-se que a infecção por esse parasito atinja 30% da população mundial sendo a maioria assintomática (JONES et al., 2006). Infecções sintomáticas pelo *T. gondii* geralmente estão associadas à supressão do sistema imune do hospedeiro (ZUFFEREY et al., 1993; LUFT et al., 1983; 1984; WONG et al., 1984; PORTER & SANDE, 1992; JONES et al., 1996; LEPORT et al., 1996).

Alguns dos medicamentos disponíveis para controle da infecção do parasito incluem pirimetamina, sulfadiazina, clindamicina, atavaquane, trimetoprim-sulfametaxazole (IACHERI et al., 2008). Esses medicamentos têm efeitos colaterais variando de brandos a graves, alguns impossibilitando o tratamento de gestantes e pacientes que sofrem da síndrome da imunodeficiência adquirida, devido à comprovada teratogenicidade e toxicidade, respectivamente (LUFT & REMINGTON, 1992).

O objetivo desse trabalho é de estudar derivados de naftoquinonas no controle da infecção *in vitro* por *T. gondii*, já que compostos desse grupo químico mostraram intensa atividade contra parasitos como *Plasmodium falciparum* e *Leishmania amazonensis* (DA SILVA et al., 2009). Ademais, esses compostos inibem o crescimento de células da linhagem de leucemia humana K562, pois são bons indutores de espécies reativas de oxigênio (ROS) (NETTO et al., 2010). Como ROS controlam o desenvolvimento do *T. gondii in vitro* (MURRAY et al., 1985) nossa hipótese é que esse compostos irão controlar o crescimento desse parasito.

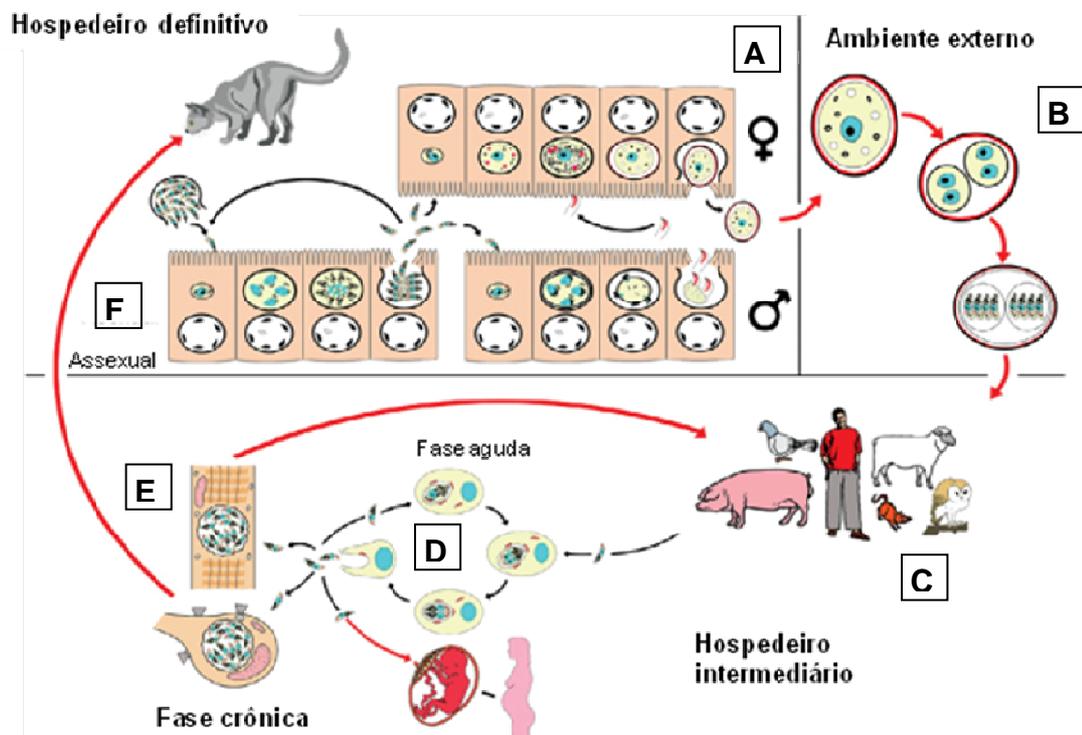
2. Revisão da literatura

2.1. Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*.

O ciclo de vida de *T. gondii* é marcado por duas fases: sexual e assexual. A fase sexuada ocorre no intestino do hospedeiro definitivo, os felídeos, resultando na excreção de oocistos resistentes no ambiente (DUBEY et al., 1970; HUTCHISON et al., 1969; 1971; FRENKEL et al., 1970; OVERDULVE, 1970; SHEFFIELD, 1970) (Esquema 1.A). Esses oocistos ainda imaturos passam por processo de esporulação levando a formação de dois esporocistos cada qual contendo quatro esporozoítas

(FERGUSON et al. 1979) (Esquema 1.B). Animais de sangue quente podem se tornar infectados pela ingestão de oocistos presentes em água e alimentos contaminados (DUBEY, 1996; DUBEY et al., 1996; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003) (Esquema 1.C). Uma vez ingeridos, os esporozoítas contidos nesses oocistos são liberados pela ação de enzimas digestivas presentes no estômago e no intestino delgado, como consequência do processo digestivo o esporozoíta é liberado tornando-se capaz de infectar enterócitos ou células calceiformes do epitélio intestinal e entrar na lâmina própria onde infectam uma gama de tipos celulares, exceto eritrócitos. Nestas células, essa forma se replica por endodiogenia e se diferencia em taquizoíta que tem replicação rápida e assexuada (DUBEY et al. 1997; SPEER & DUBEY, 1998) (Esquema 1.C). Esse estágio assexuado é conhecido como o ciclo lítico, pois as células hospedeiras se rompem e novas são infectadas. Durante essa etapa, o parasito é capaz de se disseminar por todos os órgãos do organismo (GAZZINELLI et al., 1992; WONG & REMINGTON, 1994) (Esquema 1.D). Finalmente, a pressão do sistema imunológico converte as formas de replicação rápida em formas de replicação lenta, os bradizoítas, que se localizam em cistos teciduais (GROSS & BOHNE, 1994; HUNTER & REMINGTON, 1994) (Esquema 1.E). Esses cistos formam-se particularmente no músculo e no cérebro, e podem ser abrigados assintomaticamente para o resto da vida (JACOBS et al., 1960 apud FERGUSON, 2009; ISRAELSKI, 1989). Cistos teciduais também são outra via de infecção, felídeos e outros animais de sangue quente que ingerem cistos teciduais, presentes em carnes de mamíferos e aves, se tornam infectados (DUBEY & FRENKEL, 1972; 1976; DUBEY, 1996; 2001) (Esquema 1.F). Felídeos excretam oocistos após 3 a 10 dias da ingestão de bradizoítas e 14 dias ou mais após ingestão de taquizoítas ou oocistos (DUBEY & FRENKEL, 1976; DUBEY, 1996; FREYRE et al., 1989). No ciclo sexuado, cinco tipos de esquizontes morfológicamente distintos desenvolvem-se no intestino dos felídeos, após a ingestão de cistos teciduais, antes do processo de gametogênese começar e são denominados tipos A a E (DUBEY & FRENKEL, 1972). Os esquizontes tipo D replicam-se por meio de esquizogonia, seus núcleos sofrem duas ou mais divisões e não há divisão do citoplasma (FERGUSON et al., 1974; PIEKARSKI et al., 1971; SHEFFIELD, 1970). Após algumas divisões os núcleos originam células filhas, denominados merozoítas (SHEFFIELD, 1970). Os merozoítas saem do interior do esquizonte e provavelmente dão origem a gametas feminino e masculino

(PIEKARSLI et al., 1971). Os gametas femininos ou macrogametas são encontrados acima do núcleo das células epiteliais, próximos as microvilosidades do intestino delgado, e possuem estrutura esférica com um núcleo (FERGUSON et al., 1975). Os gametas masculinos ou microgametas possuem formato elipsóide a ovóide e possuem uma estrutura chamada de perforatorium na porção anterior e dois flagelos na porção posterior (DUBEY & FRENKEL, 1972). Os gametas masculinos são liberados no lúmen intestinal e fecundam os macrogametas que irão formar os oocistos. Com a ruptura das células epiteliais intestinais ocorre a liberação dos oocistos no lúmen do intestino (FERGUSON et al., 1975).



Esquema 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* (Modificado de FERGUSON, 2002). (A) Após 3 a 10 dias de ingestão de formas infectivas do parasito como cistos teciduais, por felídeos, os oocistos são produzidos pela fusão dos gamontes masculino e feminino no intestino, e os oocistos são liberados através das fezes; (B) a liberação dos oocistos permite sua esporulação no ambiente, dando origem a dois esporocistos, cada um possuindo quatro esporozoítas; (C) a ingestão de alimentos ou água contaminada com oocistos leva a liberação dos esporozoítas no intestino e consequente invasão desse estágio às células epiteliais do intestino, os esporozoítas se dividem e se diferenciam em taquizoítas, essa forma é de replicação rápida; (D) tal forma é capaz de se disseminar para órgãos e tecidos onde o alcance das células do sistema imune é lento, podendo inclusive atravessar a barreira transplacentária de gestantes que sofreram infecção por *T. gondii* durante a gravidez ou reativação da fase aguda da infecção de *T. gondii* previamente adquirida; (E) cistos teciduais contendo bradizoítas, estágio de replicação lenta, são mantidos encistados por pressão do sistema imunológico na fase crônica da infecção; (F) cistos teciduais ingeridos através do consumo de carne crua pelo hospedeiro definitivo (felídeos) ou intermediário (mamíferos e aves), sofrem a ação de enzimas do trato gastrointestinal

levando a liberação de bradizoítas, que invadem as células epiteliais e replicam-se dentro destas de forma assexuada.

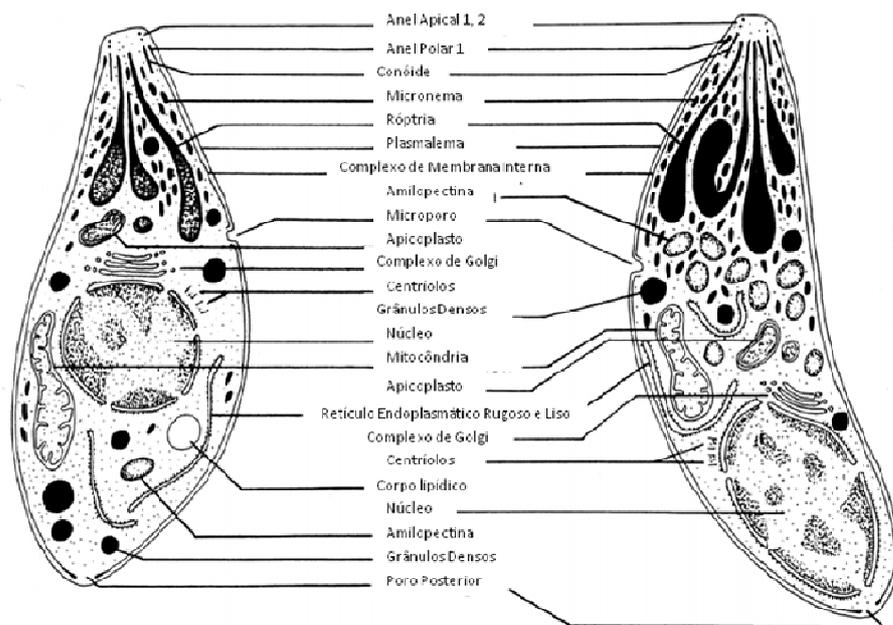
2.2. Comparação ultraestrutural de taquizoítas e bradizoítas

O termo taquizoíta foi criado por FRENKEL (1973) para descrever o estágio de replicação rápida na maioria das células do hospedeiro intermediário e nas células não epiteliais do hospedeiro definitivo. Essa forma possui formato de lua crescente e aproximadamente 2-6 μ m de comprimento, em que a porção anterior corresponde ao conóide e a porção posterior corresponde à região basal arredondada. Ultraestruturalmente, o taquizoíta consiste de várias organelas e corpos de inclusão incluindo a película externa, anéis apicais, anéis polares, conóide, roptrias, micronemas, microporos, retículo endoplasmático liso e rugoso, mitocôndria, microtúbulos subpeliculares, complexo de Golgi, grânulos densos, grânulos de amilopectina (raros, podem ser ausentes), organela de quadrupla membrana tipo plastídeo (apicoplasto) e o núcleo situado na porção central da célula (DE SOUZA & CHAGAS, 1972 apud DUBEY et al., 1998; KÖHLER et al., 1997; VIVIER & PETITPREZ, 1972 apud DUBEY et al., 1998; DE SOUZA & SOUTO-PADRÓN, 1978 apud DUBEY et al., 1998; DE MELO & DE SOUZA, 1997).

A película externa do taquizoíta consiste em três membranas, o plasmalema e duas membranas internas intimamente fechadas formadas por vesículas achatadas denominadas de complexo de membrana interna (PORCHET-HENNERE et al., 1985 apud DUBEY et al., 1998). A membrana interna é descontínua a ponta anterior alcançando apenas parte da estrutura cilíndrica, o conóide, o qual é formado por seis a oito elementos de microtúbulos organizados em forma de mola comprimida. O anel polar 1 é uma estrutura espessa localizada lateralmente na extremidade do complexo de membranas internas. O anel polar 2 é a estrutura de onde saem vinte e dois microtúbulos subpeliculares que passam longitudinalmente ao longo de todo comprimento da célula. Na porção anterior encontram-se organelas claviformes, denominadas roptrias, e organelas com estrutura de bastonete, denominadas micronemas (Esquema 2). Os grânulos densos ocupam praticamente todo o corpo celular (DE SOUZA & CHAGAS, 1972 apud DUBEY et al., 1998; VIVIER & PETITPREZ, 1972 apud DUBEY et al., 1998; DE SOUZA & SOUTO-PADRÓN, 1978 apud DUBEY et al., 1998; DE MELO & DE SOUZA, 1997;).

O termo bradizoíta também foi criado por FRENKEL (1973) para designar as formas de replicação lenta. Os bradizoítas estão contidos em cistos teciduais, cujas

estruturas possuem variação de diâmetro de acordo com a cepa de *T. gondii*, tempo de formação e tipo celular o qual está localizado (DUBEY et al., 1998). Os cistos teciduais são formados por componentes do hospedeiro e do parasito (FERGUSON & HUTCHISON, 1987 apud DUBEY et al., 1998). A parede do cisto é rica em quitina, glicoproteínas e glicolipídeos (BOOTHROYD et al., 1997). Uma glicoproteína denominada CST1 contida na parede de cistos teciduais é reconhecida pela lectina de *Dolichus biflorus* (ZHANG et al., 2001). Outra possível forma de detecção de cistos teciduais é através de microscopia de contraste de fase no qual o cisto aparece refringente (DZIERSZINSKI et al., 2004). Bradizoítas são estruturalmente parecidos com os taquizoítas, com algumas características excepcionais como a posição do núcleo na região posterior, roptrias mais elétrons-densas e frequentemente enroladas sobre si próprias, poucos grânulos densos, numerosos grânulos contendo amilopectina e ausência de corpos lipídicos (DUBEY et al., 1998).



Esquema 2. Comparação ultraestrutural entre os estágios taquizoíta e bradizoíta de *Toxoplasma gondii* (modificado de DUBEY et al., 1998).

2.3. Entrada e estabelecimento do parasita na célula hospedeira

Os eventos de entrada e de formação do vacúolo parasitóforo envolvem a atuação dos três tipos de organelas secretórias descritas para *T. gondii* como micronema, roptria e grânulos densos (CARRUTHERS & SIBLEY, 1997).

Embora *T. gondii* não possua estruturas de locomoção como flagelos, a invasão das células hospedeiras ocorre por penetração ativa através da mobilidade direcional chamada de *gliding* (KING, 1988). Esse processo consiste no

deslizamento do parasito sobre a membrana da célula hospedeira através da secreção cálcio dependente de proteínas tipo adesinas, denominadas proteínas do micronema (CARRUTHERS et al., 1999; 2000; SOLDATI et al., 2001). Essas proteínas adesivas conectam-se com receptores na célula hospedeira, e através do trabalho direcionado do sistema actina-miosina do parasito acoplado a esse reconhecimento da superfície da célula hospedeira leva a interiorização do parasito (SOLDATI et al., 2001). A dinâmica do movimento consiste de reconhecimento da célula hospedeira, atuação do sistema actina-miosina do parasito e desacoplamento através da liberação das proteínas ancoradas a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) na célula hospedeira (SIBLEY et al., 1985; MORISAKI et al., 1995; SUSS-TOBY et al., 1996; SOLDATI et al., 2001; SIBLEY, 2003).

Durante o processo de entrada na célula hospedeira, o parasito é comprimido através de uma constrição na membrana plasmática denominada de junção móvel (KING, 1988). Esse conjunto exclui as proteínas da membrana plasmática da célula hospedeira, formando um vacúolo parasitóforo com composição proteica diferente e única (MORDUE et al., 1999). Esses vacúolos são formados por lipídeos neutros provenientes da célula hospedeira e por lipídeos e proteínas secretadas pelos parasitos (MORDUE et al., 1999; HÅKANSON et al., 2001; CHARRON & SIBLEY, 2002).

Uma hora após interiorização, segue-se a secreção de proteínas provenientes das róprias e dos grânulos densos que alteram a composição da membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) acrescentando proteínas e lipídeos (BECKERS et al., 1994; CESBRON-DELAUW, 1994; SINAI & JOINER, 2001; BRADLEY et al., 2004). As proteínas secretadas pelo bulbo das róprias são chamadas de ROPs responsáveis por manter mitocôndrias do hospedeiro próximas ao vacúolo parasitóforo (SINAI et al., 1997; SINAI & JOINER, 2001); modular o crescimento e a virulência (EL HAJJ et al., 2007); impedir a conexão com as vias de endocitose/exocitose através da alteração da sinalização da célula hospedeira, não permitindo, dessa forma, a fusão com os lisossomos, cujo mecanismo levaria a destruição do parasito (SIBLEY et al., 1985; SAEIJ et al., 2007; PAWLOWSKI et al., 2011).

Os grânulos densos secretam proteínas denominadas GRA (CHARIF et al., 1990; LERICHE & DUBREMETZ, 1991). Proteínas GRA podem estar localizadas no vacúolo parasitóforo de forma solúvel ou transmembrana associada ou a

membranas de vesículas tubulares do retículo endoplasmático do parasito no espaço intervacuolar ou a MVP (DUBREMETZ et al., 1993; CESBRON-DELAUW, 1994; SIBLEY et al. 1995). O complexo de vesículas tubulares é estabelecido após a formação do vacúolo parasitóforo e persiste durante o desenvolvimento do parasito dentro vacúolo (SIBLEY et al., 1995). Algumas proteínas GRA podem se localizar tanto no lúmen do vacúolo quanto associados ao complexo de vesículas tubulares, como a GRA1; outras somente associadas de forma transmembrana à trama de vesículas tubulares, como a GRA2; e outras de forma transmembrana na MVP, como GRA3 e GRA5 (ACHBAROU et al., 1991; LECORDIER et al., 1993; OSSORIO et al., 1994). A continuidade estabelecida entre a MVP e o complexo de vesículas tubulares permite a difusão de componentes citoplásmicos ao longo do comprimento do túbulo (SCHWAB et al., 1994). Proteínas GRA são responsáveis por formar poros pelos quais passam os nutrientes das células hospedeiras, como íons, ATP, carboidratos, aminoácidos (SCHWAB et al., 1994; SIBLEY et al., 1995).

2.4. Linhagens clonais de cepas de *Toxoplasma gondii*

Existem três tipos de linhagens clonais (tipo I, II, e III) na Europa e na América do Norte que diferem geneticamente por 1 % ou menos (HOWE & SIBLEY, 1995; GRIGG et al., 2001; SU et al., 2003). No Brasil, essas linhagens clonais são raramente encontradas, porém outros tipos recombinantes foram descobertos e designados como BrI, BrII, BrIII e BrIV. Sendo a BrI caracterizada como a mais virulenta, BrII e BrIV são levemente virulentos e BrIII foram consideradas não virulentos (PENA et al., 2008). Análises das populações clonais de *T. gondii* sugerem que através da recombinação de quatro conjuntos de genes ancestrais produziram as progênes recombinantes, as quais são selecionadas pela resposta dos hospedeiros (HOWE & SIBLEY, 1995; GRIGG et al., 2001; KHAN et al., 2007; SIBLEY & AJIOKA, 2008). Como resultado dessa seleção, existem somente dois tipos de alelos para a maioria dos genes da maior parte das cepas (AJZENBERG et al., 2004). As cepas mais extensamente caracterizadas são as cepas do tipo I, como RH e GT-1; do tipo II, como ME-49 e seus derivados PDS, PLK, PTg; e do tipo III, como CEP e VEG (SAEIJ et al., 2005).

A virulência das cepas é normalmente definida pelo valor de LD50, referente à metade da dose (quantidade de parasitos) que mata camundongo (hospedeiro) (SAEIJ et al., 2005). A dose letal de parasitos da cepa tipo I é um único parasito enquanto o valor da LD50 de cepas do tipo II e III é em torno de 10^3 a 10^5 parasitos,

respectivamente (SIBLEY & BOOTHROYD, 1992). Cepas do tipo I são caracterizadas como mais virulentas devido à capacidade de cruzar barreiras biológicas com maior facilidade *in vitro* e *in vivo* (BARRAGAN & SIBLEY, 2002; BARRAGAN & SIBLEY, 2003); possuem alta taxa de crescimento associadas à alta taxa de re-invasão, uma vez que são infecciosamente viáveis por mais tempo fora da célula hospedeira que os outros tipos de cepas. Além disso, cepas do tipo I são capazes de atrair mais neutrófilos para o sítio de infecção o que favorece sua disseminação e crescimento no hospedeiro (BLISS et al., 2001).

A capacidade desses parasitos em sobreviver dentro de células do sistema imunológico é outro fator determinante para sua virulência (MORDUE et al., 2003). Por exemplo, as cepas do tipo I são capazes de inibir a translocação do fator de transcrição conhecido como fator nuclear kappa B associado à resposta inflamatória para o núcleo, dessa maneira é capaz de inibir a ativação dos mecanismos microbicidas das células hospedeiras após ativação do sistema imunológico (DOBBIN et al., 2002).

2.5. Manipulação dos mecanismos microbicidas efetores por *Toxoplasma gondii* pelas cepas virulentas e avirulentas.

O controle do *T. gondii* pelo hospedeiro é dependente de mecanismos acionados pela resposta de citocinas inflamatórias, como interleucina 12 (IL-12), produzidas por células do sistema imunológico através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores *Toll-like* (TLR) (GAZZINELLI et al., 1994; YAROVINSKY et al., 2005; 2006). A IL-12 por sua vez atua, principalmente, sobre células NK e células T induzindo a secreção da citocina pró-inflamatória interferon- γ (IFN- γ) (GAZZINELLE et al., 1993). O IFN- γ aciona algumas funções microbicidas em camundongos contra *T. gondii*, como a ativação de GTPases reguladas por IFN- γ (IRGs) (ZHAO et al., 2009), a indução de intermediários de nitrogênio e de oxigênio (SCHARTON-KERSTEN et al., 1997), degradação de triptofano em células humanas (PFEFFERKORN, 1984) e autofagia (ANDRADE et al., 2006; LING et al., 2006).

Entretanto, *T. gondii* é capaz de controlar esses mecanismos efetores e, dependendo do grau de virulência da cepa que está associado ao conjunto de genes de virulência, o protozoário será mais ou menos resistentes a esses fatores (BLISS et al., 1999; ROBBEN et al., 2004). Cepas do tipo I são capazes de inibir a acumulação de IRG de camundongos ao redor de vacúolo parasitóforo

(STEINFELDT et al., 2010; PAWLOWSKI et al., 2011). As IRGs são da família de dinaminas e atuam nos vacúolos contendo os parasitos (HUNN et al., 2010). Algumas IRGs estão associadas a MVP permitindo o rompimento do vacúolo parasitóforo e liberando os parasitos no citoplasma (FENTRESS et al., 2010; STEINFELDT et al., 2010). A fusão dessas duas membranas mata o parasito (SIBLEY et al., 1985). As cepas do tipo I e II são capazes de expressar em maior quantidade a ROP18, pertencente à família de quinases ROP2 (FENTRESS et al., 2010; STEINFELDT et al., 2010). A ROP18 é capaz de fosforilar o sítio de ligação do nucleotídeo das IRGs, prevenindo sua acumulação na MVP, evitando assim a fusão do lisossomo (FENTRESS et al., 2010; STEINFELDT et al., 2010).

A ROP5 representa um conjunto de quinases polimórficas associadas à virulência de *T. gondii* de camundongos ao redor do vacúolo parasitóforo (REESE et al., 2011). Cepas do tipo I e III expressam ROP5 (SAEIJ et al., 2006; REESE et al., 2011). Cepas do tipo I nas quais genes polimórficos que expressam ROP5 foram removidos tornam-se avirulentos, pois 10^6 parasitos não são suficientes para matar nenhum camundongo (BEHNKE et al., 2011). A ROP5 contribui como um fator de virulência em cepas que não expressam ROP18, sugerindo um modo de ação independente entre essas enzimas (SAEIJ et al., 2006). Contudo a função da ROP5 ainda não foi elucidada, acredita-se que ela esteja associada à formação do vacúolo parasitóforo no lado citosólico da MVP (EL HAJJ et al., 2007).

A ROP16 é capaz de alterar a transcrição de células de fibroblasto de prepúcio humano ou macrófagos murinos infectados com cepas do tipo II e III (SAEIJ et al., 2007; JENSEN et al., 2011). Macrófagos ativados com lipopolissacarídeo (LPS) e infectados com *T. gondii* da cepa tipo II que expressam ROP16 de cepas do tipo I e III, inibem a resposta induzida por IL-12 como consequência da inibição da atividade transcripcional do fator nuclear kappa B (SAEIJ et al. 2007; ROSOWSKI et al., 2011). Acredita-se que esta inibição é resultado da fosforilação do “transdutor de sinal e ativador de transcrição” (STAT) 3 e STAT6 que aciona a ativação da via alternativa de macrófagos, uma importante via de inibição da resposta pró-inflamatória (JENSEN et al., 2011). A ROP16 de cepas do tipo I e III é capaz de fosforilar tanto STAT3 quanto STAT6 *in vitro* e a das cepas do tipo II não é capaz de fosforilar STAT3 (YAMAMOTO et al., 2009; ONG et al., 2010).

2.6. Fatores determinantes na conversão de Taquizoíta a Bradizoíta

Cistos teciduais contendo bradizoítas de *T. gondii* podem ser detectados em camundongos seis a sete dias após a ingestão de cistos teciduais e podem persistir ao longo da vida do hospedeiro (DUBEY, 1997). O crescimento do parasito está intimamente interligado com os estágios de conversão, pois a transformação gradual de desenvolvimento rápido para lento no ciclo celular do taquizoíta leva a entrada do programa de diferenciação a bradizoíta (RADKE & WHITE, 1998). A população de parasitos em processo de conversão está, em sua maioria, no estágio tardio do ciclo celular S/G2, diferentemente dos taquizoítas em que o estágio G2 é praticamente ausente (JEROME et al., 1998; RADKE & WHITE, 1998). Uma vez diferenciados em bradizoítas, os parasitos completam a entrada no estado quiescente G₀ (RADKE & WHITE, 1998). Os fatores que levam a indução da conversão podem ser estresse exógeno ou espontâneo (BOHNE et al., 1994).

Os fatores *in vitro* externos conhecidos são pH alcalino entre 8 - 8,2 nas células hospedeiras ou nos parasitos sozinhos, antes de infectarem as células hospedeiras, e choque térmico (43°C) das células hospedeiras anteriormente a invasão de parasitos e adicionalmente após a infecção por 12-48 horas (SOETE et al., 1994; WEISS et al., 1995; SOETE & DUBREMETZ, 1996; RADKE & WHITE, 1998). Outro fator ligado à diminuição do crescimento e conversão a bradizoítas é a depleção do aminoácido arginina, o qual o parasito capta das células hospedeiras; a inibição da biossíntese de pirimidina juntamente com a inibição da via de captação desse componente através da célula; longos períodos (12 horas) fora da célula hospedeira e o sistema imunológico do hospedeiro (BOHNE & ROSS, 1997; YAHIAOUI et al., 1999; APPELBERG, 2006). O motivo pelo qual o sistema imunológico é responsável por induzir diminuição do crescimento do parasito e, portanto, induzir o processo de conversão de taquizoíta a bradizoíta, está justamente na depleção de nutrientes durante o processo de infecção *in vivo* (APPELBERG, 2006).

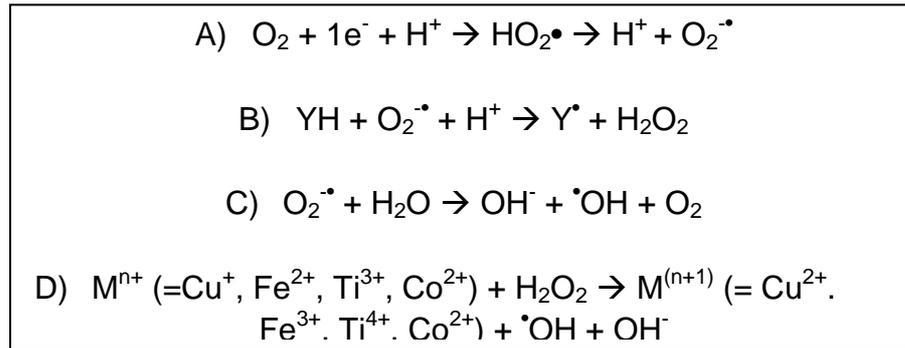
A resposta imune mediada por células leva ao processo de conversão de parasitos tanto *in vivo* quanto em culturas de macrófagos murinos devido à produção da citocina IFN- γ (SUZUKI et al., 1989; BOHNE et al., 1993). No entanto, IFN- γ não é capaz de aumentar a conversão do parasito em outros tipos de células como astrócitos murinos, células neuronais de ratos e fibroblastos de prepúcio humano (JONES et al., 1986 apud SKARIAH et al., 2010; LUDER et al., 1999). O principal

motivo para esse fenômeno é que essas células não são estimuladas a produzir óxido nítrico (NO) por IFN- γ (BOHNE et al., 1994; LUDER et al., 2003; IBRAHIM et al., 2009). NO é capaz de reduzir o crescimento dos parasitos e promover o processo de conversão (BOHNE et al., 1994; LUDER et al., 2003; IBRAHIM et al., 2009). NO danifica enzimas da cadeia respiratória contendo centros ferro-sulfuroso, sugerindo que as ações promotoras dessa molécula para conversão de taquizoíta a bradizoíta estão envolvidas com a danificação das mitocôndrias das células hospedeiras e/ou parasitos, promovendo depleção de nutrientes e energia (DE GROOTE et al., 1995; FANG, 2004).

A resposta imune mediada por células, produtoras de IFN- γ , também é requerida para prevenir a reativação patológica da infecção, ou seja, quando bradizoítas convertem-se em taquizoítas, processo comum em indivíduos imunossuprimidos (SUZUKI et al., 1989). A supressão de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ possibilita a reativação de bradizoítas durante a infecção crônica (GAZZINELLI et al., 1992). Isso indica que IFN- γ pode agir em algumas células hospedeiras estabilizando os cistos no estado G₀, prevenindo a reativação durante a infecção crônica e eliminando os taquizoítas que possam emergir (JONES et al., 1986 apud SKARIAH et al., 2010).

2.7. Espécies reativas de oxigênio

ROS são moléculas derivadas de oxigênio que contém um ou mais par de elétrons desemparelhados, tais como ânion superóxido (O₂^{•-}) e radical hidroxila (ILAN et al., 1976 apud CADENAS, 1989). O O₂^{•-} é produzido pela redução de um elétron do oxigênio molecular (O₂) e é considerado ROS primário pela sua capacidade de gerar ROS secundários (VALKO et al., 2005) (Esquema 3A). O₂^{•-} pode agir como fator redutor quando interage com outras moléculas, como enzimas e substâncias antioxidantes, e produz como subproduto peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (MCCORD & FRIDOVICH, 1969; VALKO et al., 2005) (Esquema 3B). O H₂O₂ pode ser convertido a O₂ e água por enzimas presentes nos peroxissomos, como a catalase (CAT), ou pode sofrer reação de Haber-Weiss ao interagir com O₂^{•-} produzindo radical hidroxila, cujo poder oxidante supera os demais ROS (LIOCHEV & FRIDOVICH, 1994; VALKO et al., 2004) (Esquema 3C). Radical hidroxila também pode ser formado pela reação de Fenton a partir da interação de H₂O₂ e íons metálicos livres (LEONARD et al., 2004; VALKO et al., 2005) (Esquema 3D).



Esquema 3. Geração de espécies reativas de oxigênio - ciclo redox. A) Redução do oxigênio molecular (O_2) por um elétron leva produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$); B) Oxidação de molécula alvo (YH) pelo $O_2^{\bullet -}$ e produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e molécula alvo oxidada (Y^\bullet); C) Reação Haber-Weiss ocorre quando há um excesso de $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2 levando a produção de radicais hidroxila ($\bullet OH$); D) Reação de Fenton ocorre através da oxidação de íons de metais de transição (M^{n+}) como cobre, ferro, titânio e cobalto, pelo H_2O_2 levando a produção de $\bullet OH$.

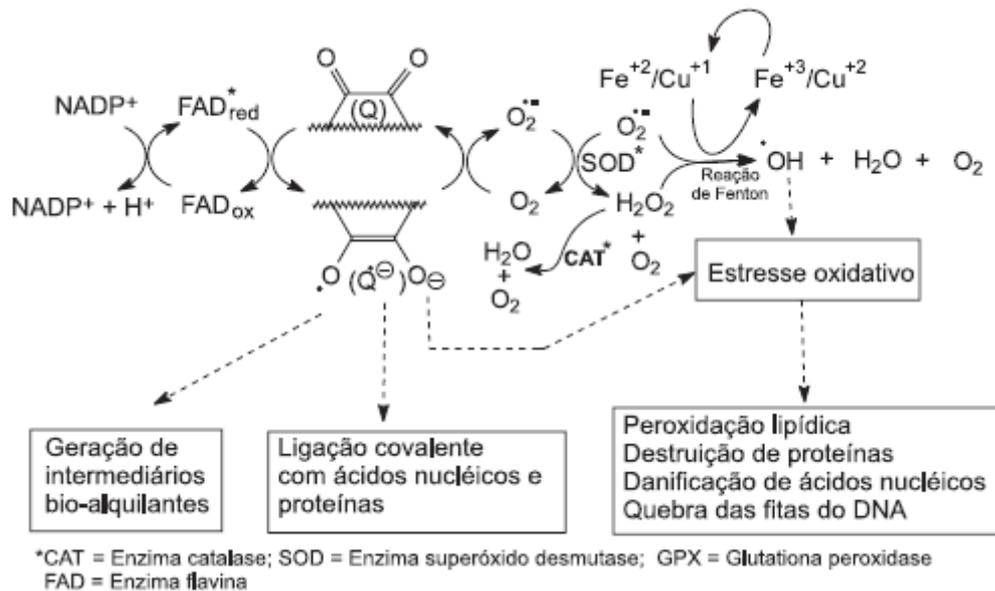
Algumas das vias de redução do O_2 ao $O_2^{\bullet -}$ ocorrem por meio da ação de enzimas como NADPH citocromo P450 redutase, DT- diaforase (quinona oxiredutase), xantina oxidase/xantina desidrogenase e citocromo b5 redutase, sozinhos ou combinados (VENDITTI et al., 1998; ZANGAR et al., 2004;).

O $O_2^{\bullet -}$ é produzido pela redução do O_2 por um elétron obtido de eletrófilos como, por exemplo, compostos quinoídicos (BOLTON et al., 2000). Esses compostos são reduzidos a radicais (Q^\bullet) semiquinonas por um elétron pela reação enzimática de flavoproteínas, como a NADPH citocromo P450 oxidase, ou a hidroquinonas pela NADPH quinona oxirredutase (BOLTON et al., 2000). Enzimas como a NADPH quinona oxidase realizam a transferência de dois elétrons de quinonas convertendo-as a hidroquinonas, subproduto da reação que será posteriormente eliminado (BOLTON et al., 2000; PINK et al., 2000; CHEN & HU, 2009). O radical semiquinona, por sua vez, transfere um elétron ao O_2 reduzindo-o, esse processo é denominado ciclo redox (BOLTON et al; 2000) (Esquema 4). A partir do $O_2^{\bullet -}$ pode ocorrer a produção de H_2O_2 pela ação da superóxido dismutase (SOD).

Células do sistema fagocítico são capazes de produzir ROS em resposta ao reconhecimento de microorganismos por meio de NADPH oxidases levando ao controle de patógenos (AUTEN et al., 2002; YAO et al., 2008). A NADPH oxidase de fagócitos ativados é um complexo formado por múltiplas subunidades associadas ao complexo transmembrana do citocromo b_{558} ($gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$), cujo sítio de ligação

interage com NADPH e FAD. Esse complexo possui também dois centros heme que são críticos para o transporte de elétrons a partir de NADPH para O_2 para gerar $O_2^{\bullet-}$. A glicoproteína gp91^{phox} associa-se a outra subunidade, p22phox, a qual se torna ativada após fosforilação e, conseqüente, recrutamento de outras três proteínas reguladoras citosólicas, como p47phox, p67phox e p40phox, e uma GTPase, a Rac1, para formar o complexo funcional NADPH oxidase associado a membrana plasmática, ou ao fagossomo, ou à membrana de grânulos de fagócitos polimorfonucleares (LAMBETH, 2004; BEDARD & KRAUSE, 2007). O processo de montagem permite que as subunidades do complexo sejam recrutadas quando há uma ativação dos fagócitos em resposta a uma infecção microbiana (LAMBETH, 2004; BEDARD & KRAUSE, 2007). Entretanto, a infecção por *T. gondii* possui capacidade de inibir a produção de ROS em macrófagos ativados (WILSON et al., 1980). Ao contrário, a produção de ROS é ativa em macrófagos ativados infectados com a forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, no entanto, os vacúolos contendo taquizoítas de *T. gondii* não possuem atividade da NADPH oxidase (CARVALHO & DE SOUZA, 1989). Além disso, *T. gondii* possui enzimas antioxidantes como piroxiredoxina, CAT e superóxido dismutase (SOD) (ODBERG-FERRAGUT et al., 2000; SON et al., 2001; KWOK et al., 2004).

A implicação da produção de ROS na célula pode levar aos danos nas bases do DNA pela remoção de átomos de hidrogênio, podem alterar os centros de carbono das moléculas de lipídeo, formando radical peroxil, e podem oxidar proteínas (AUTEN et al., 2002; DALLE-DONNE et al., 2003). O fator determinante para que a produção de ROS possa induzir seus efeitos microbicidas, e possivelmente levar a célula ao estágio de morte celular programada, dependerá da quantidade relativa de ROS comparada à quantidade de moléculas antioxidantes que existem nas células e parasitos, como α -tocoferol, vitamina C, enzimas SOD, CAT, glutationa redutase e glutationa peroxidase (ORRENIUS, 1985). Se a produção de ROS exceder a capacidade dos efeitos protetores derivados dos antioxidantes, as células entram em morte celular programada (ORRENIUS, 1985; VALKO et al., 2005). De fato, o estresse oxidativo pode causar mais danos a alguns microrganismos do que as células hospedeiras (MOLINA et al., 1996).



Esquema 4. Ciclo redox induzido por quinonas (retirado de DA SILVA et al., 2003). Os compostos quinóidicos são reduzidos a radicais ($Q^{\cdot-}$) semiquinonas por um elétron pela reação enzimática de flavoproteínas, como a NADPH citocromo P450 oxidase, ou a hidroquinonas pela NADPH quinona oxirredutase. O radical semiquinona, por sua vez, transfere um elétron ao oxigênio molecular (O_2) reduzindo-o a ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A partir do $O_2^{\cdot-}$ pode ocorrer a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da superóxido dismutase (SOD).

2.8. Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma doença causada pela infecção do *T. gondii*, podendo levar a abortos, má formação fetal, distúrbios de visão em hospedeiros imunocompetentes e encefalite toxoplásmica em imunocomprometidos (MONTROYA & LIESENFELD, 2004). Esse parasito acomete aproximadamente 30% da população mundial, a maioria sem sintomas clínicos (JONES et al., 2006). A infecção pelo parasito pode ser adquirida oralmente por consumo de carne crua ou mal cozida que possua cistos teciduais ou por ingestão de água contaminada ou alimentos contendo oocistos (DESMONTS et al., 1965; KEAN et al., 1969; SABIN & OLITSKY, 1937; DE MOURA et al., 2006). Além disso, outra forma é por transmissão congênita que ocorre quando a mãe se torna infectada durante a gravidez ou quando ocorre reativação de uma infecção latente adquirida antes da concepção (VOGEL et al., 1996; REMINGTON et al., 2006). Os taquizoítas circundantes cruzam a barreira transplacentária causando a infecção vertical (AMBROISE-THOMAS & PELLOUX, 1993). Infecção congênita pode levar a variedade de manifestações no feto ou na criança, como abortos espontâneos e partos prematuros; quando a criança sobrevive pode apresentar sinais clássicos de toxoplasmose, como hidrocefalite ou microcefalite, calcificações cerebrais ou coriorretinite (MCAULEY et al., 1994;

REMYINGTON et al., 2006). Mesmo uma criança que nasça aparentemente normal, pode desenvolver toxoplasmose ocular ou mesmo sintomas envolvendo o sistema nervoso central em estágios tardios da vida (MCAULEY et al., 1994; REMINGTON et al., 2006).

Indivíduos infectados após o nascimento são geralmente assintomáticos (MONTROYA & LIESENFELD, 2004; REMINGTON et al., 2006). Uma vez infectados, humanos permanecem com o parasito durante toda a vida. Pequena parcela de pessoas saudáveis infectadas com *T. gondii* depois do nascimento desenvolve sintomas leves, que incluem febre, mal-estar e linfadenopatia (MCCABE et al., 1987; MONTROYA & LIESENFELD, 2004; REMINGTON et al., 1974). Em casos raros, humanos previamente saudáveis podem desenvolver a doença grave e até mesmo fatal, incluindo comprometimento pulmonar e visceral ou coriorretinite toxoplásmica, possivelmente pelos tipos de cepas mais virulentas (CARME et al., 2002; HOLLAND, 2003; DEMAR et al., 2007).

Indivíduos infectados com HIV e soropositivo para *T. gondii* podem desenvolver toxoplasmose cerebral (ZUFFEREY et al., 1993). Isso se deve a reativação de cistos teciduais latentes quando os pacientes tornam-se severamente imunossuprimidos, com a taxa de risco ocorrendo quando a contagem de linfócitos T- CD4+ cai abaixo de 50 células por mililitro de sangue (LUFT et al., 1983, 1984; WONG et al., 1984; PORTER & SANDE, 1992; JONES et al., 1996; LEPORT et al., 1996). As apresentações clínicas incluem encefalite focal, dor de cabeça, confusão, fraqueza motora, febre e se não tratados pode levar a convulsões, letargia, coma e até morte (LUFT et al., 1983, 1984; WONG et al., 1984).

2.9. Tratamento quimioterápico

Toxoplasmose aguda normalmente é tratada com combinação de pirimetamina e sulfadiazina junto com ácido fólico (LEPORT et al., 1988; MONTROYA & LIESENFELD., 2004; LEPORT et al., 1996). A pirimetamina atua inibindo a biossíntese de DNA por impedir a conversão de ácido fólico em ácido folínico pela enzima diidrofolato-desidrogenase (FERONE et al., 1969). A sulfadiazina é inibidor competitivo do ácido paraminobenzóico (PABA), também utilizado na biossíntese de ácido folínico (EYLES & COLEMAN, 1955).

IACHERI et al. (2008) estudaram as implicações colaterais do tratamento de diversas drogas com atividade anti-toxoplásmica em pacientes diagnosticados com coriorretinite toxoplásmica ativa, essas drogas incluíam clindamicina, sulfadiazina,

pirimetamina, trimetoprim-sulfametaxazole e atavaquane. Os efeitos colaterais em questão foram erupções cutâneas, diarreia, irritação estomacal, hemorragia, dores de cabeça, edema facial e leucocitopenia. Os pacientes tratados com clindamicina apresentaram erupções cutâneas (12%), diarreia (10%), irritação estomacal (6%) e hemorragia (2%); com pirimetamina apresentaram leucocitopenia (3%), irritação estomacal (9,1%) e dor de cabeça (3%); com sulfonamidas 22,5% dos pacientes sofreram com erupção cutânea; com trimetoprim-sulfametaxazole 12,5% apresentaram diarreia; com ataquavane 20% apresentaram diarreia e 10% edema facial.

Para tratamento de casos confirmados de toxoplasmose congênita de recém-nascidos, o protocolo de trabalho do grupo francês (SWEETMAN et al., 2007) recomenda tratamento com pirimetamina (1mg/Kg/dia), sulfadiazina (100mg/Kg/dia) e ácido fólico (50mg/semana) durante dois meses, com monitoramento através de hemograma completo. Se o tratamento for bem tolerado, deve-se prescrever por mais 10 meses uma fórmula combinada de pirimetamina (1,25mg/Kg) e sulfadoxina (25mg/kg) e administração de ácido fólico (50mg/semana). O tratamento da toxoplasmose congênita requer uma associação de pirimetamina e de sulfadiazina, dois medicamentos raramente prescritos na neonatologia devido à alta toxicidade que deve ser rigidamente monitorada (ELMALEM et al., 1985; DUVEAU et al., 1996; CHERON et al., 1987).

Devido aos efeitos colaterais diversos dos atuais quimioterápicos no tratamento de infecção de *T. gondii* são necessárias novas descobertas de compostos que mostrem efeitos potencializados em concentrações na faixa do nano a micromolar.

2.10. Naftoquinonas

A maior ocorrência de naftoquinonas se encontra em plantas da família Bignoniaceae, particularmente no gênero *Tabebuia* (OLIVEIRA et al., 1990). O lapachol é o principal representante desses compostos, sendo extraído com facilidade durante a serragem da madeira de várias espécies de ipê (LINARDI et al., 1975). O Lapachol é capaz de induzir o estresse oxidativo, podendo levar a apoptose de células tumorais (PINK et al., 1999).

Além disso, o lapachol e seus derivados semi-sintéticos apresentam outras atividades farmacológicas, como atividade antimicrobiana e antifúngica; cercaricida (prevenção da penetração de cercarias *Schistosoma mansoni* na pele); ação

moluscida (atividade contra caramujos *Biompharia glabrata*, hospedeiro intermediário de *S. mansoni*); leishmanicida (ação intracelular nas formas amastigotas de *Leishmania braziliensis*); tripanossomicida (atividade contra o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas); antimalárico (atividade contra *Plasmodium falciparum* parasitando eritrócitos), etc (AUSTIN, 1974; CARVALHO et al., 1988; GAFNER et al., 1996; KAYSER et al., 2000; PINTO et al., 2000; SANTOS et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2001; GOULART et al., 2004;). Além disso, o lapachol possui atividade antitumoral e anestésica, sendo capaz de regredir definitivamente neoplasias em 30% dos pacientes (SUBRAMANIAN et al., 1998). A utilização do lapachol é limitada por sua toxicidade e baixa biodisponibilidade (KAYSER et al., 2000).

2.11. Pterocarpanos

Pterocarpanos agem como fitoalexinas ou fitotoxinas que são compostos de baixo peso molecular produzido por plantas em resposta ao ataque de microorganismos (KAMAT et al., 1981 apud DA SILVA et al., 2009). Estes compostos inibem o crescimento de bactérias e fungos *in vivo* e *in vitro*, e sua produção durante infecção pode induzir a resistência a infecções subsequentes, entre outro grupo de produtos naturais (KAMAT et al., 1981 apud DA SILVA et al., 2009).

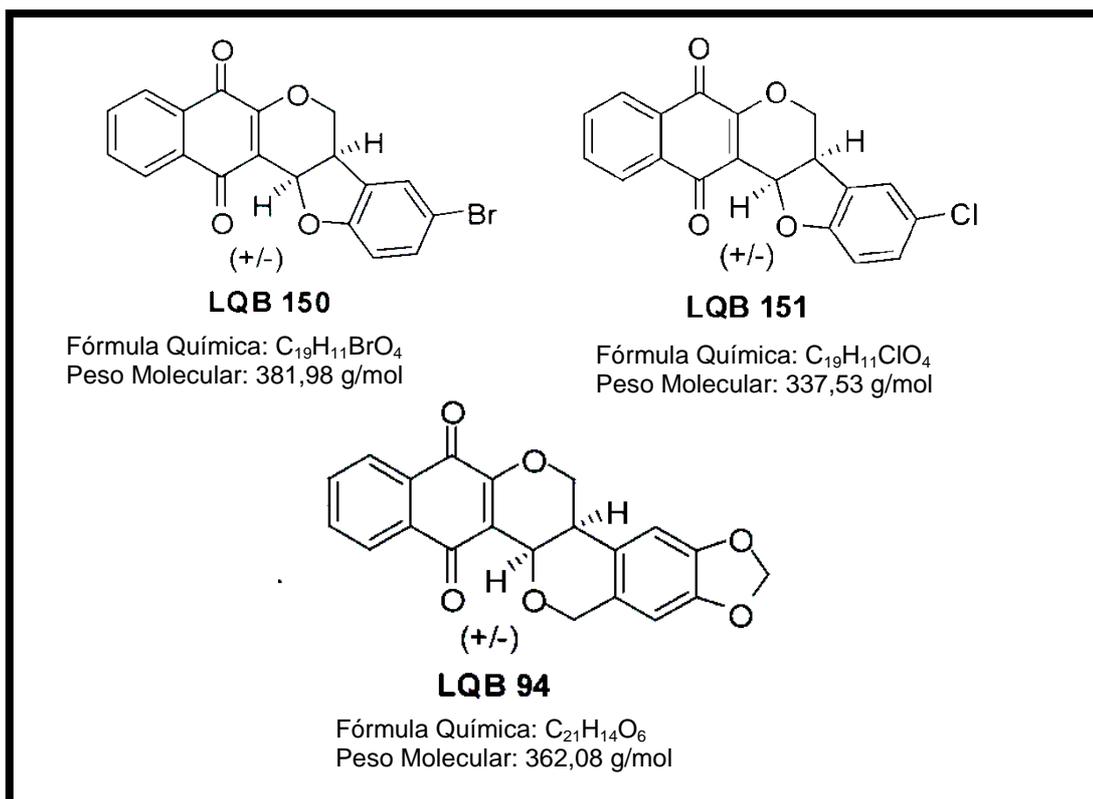
Pterocarpanos possuem outras atividades biológicas importantes como atividade antifúngica *in vivo* e *in vitro* em camundongos, atividade anti-HIV *in vitro* e atividade antiinflamatória *in vitro* (CHILPA & ESTRADA, 1995; BOYD et al., 1997; LIN et al., 2006). O catecol pterocarpano isolado de *Petalostemon purpureus* possui atividade contra células KB, linhagem de células de carcinoma epidermóide humano (CHAUDHURI et al., 1995).

2.12. Derivado de naftoquinonas

DA SILVA et al. (2009) construiu pterocarpanoquinonas a partir de pterocarpano, isolado da *Petalostemon purpureus*, e 1,4 naftoquinona, isolado de espécies de *Tabebuia*. Esses novos compostos foram eficientes em controlar populações *in vitro* de carcinoma mamário humano MCF-7, de promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Plasmodium falciparum* (uma cepa resistente a cloroquina) (DA SILVA et al., 2009). Um dos compostos testados por DA SILVA et al. (2009) foram usados nesse trabalho, aqui denominado de LQB94 (Esquema 5).

2.13. Pterocarpanoquinonas

NETTO et al. (2010) sintetizou novas pterocarpanoquinonas, dentre elas a LQB150 e LQB151, utilizadas nesse trabalho (Esquema 5). Tais pterocarpanoquinonas foram eficientes em se transformarem em radicais semiquinonas pela redução por um elétron o que conferiu a esses compostos alto poder de oxidação contra células de leucemia humana resistentes ao estresse oxidativo (NETTO et al., 2010). Os compostos LQB150 e LQB151 mostraram baixa citotoxicidade a células mononucleares do sangue periférico (PBMC) ativadas com hemaglutinina A, comparadas as linhagem de células de leucemia K562 e HL-60, a primeira com altos índices de glutaniona, que a torna resistente ao estresse oxidativo, e a segunda com níveis menores de antioxidantes (NETTO et al., 2010). PORTES et al. (2012) mostrou que esse grupo de compostos foi capaz de inibir o índice de crescimento de taquizoítas de *T. gondii*, cepa RH, em culturas de LLCKM2, esse efeito foi estabilizado na concentração de 2,5 μM , a qual também correspondeu a concentração que inibe a metade do crescimento (IC_{50}). Além disso, há evidências de alterações ultraestruturais na membrana plasmática dos parasitos causadas pelos compostos, além de induzir conversão do estágio taquizoíta para o estágio bradizoíta (PORTES et al., 2012). O possível mecanismo de ação desses compostos pode ser a ação na peroxidação dos lipídeos de membrana do parasito induzidos pelas ROS, talvez alterando a biossíntese de esteróis pelo parasito como demonstrado em estudos de outros compostos com ação anti-toxoplasma (ER119884 e E5700) (DE SOUZA et al., 2006; CAMMERER et al., 2007).



Esquema 5. Fórmula molecular, fórmula química e peso molecular das pterocarpanoquinonas testadas nesse trabalho, LQB94 sintetizada por DA SILVA et al. (2009) e LQB150 e LQB151 sintetizadas por NETTO et al. (2010). Os compostos LQB150 e LQB151 possuem cinco anéis aromáticos e diferenciam-se apenas em seus radicais, bromo ou cloro, respectivamente. O composto LQB94 possui seis anéis aromáticos.

3. Justificativa

É provável que compostos derivados de naftoquinonas, com potencial ação antiparasitária e antitumoral, possua atividade contra *Toxoplasma gondii*. A necessidade de pesquisas que busquem novos compostos contra *T. gondii* se justifica na escassez de recursos terapêuticos eficientes em inibir o crescimento parasitário e possua mínimos efeitos colaterais.

O provável mecanismo de ação dos compostos derivados de naftoquinonas é a indução de espécies reativas de oxigênio, que interferem em várias macromoléculas importantes para o funcionamento celular. Os efeitos das espécies reativas de oxigênio podem induzir alterações no parasito e na célula hospedeira, entretanto MOLINA et al. (1996) mostraram que protozoários com grande quantidade de antioxidantes, são suscetíveis aos efeitos dos radicais de oxigênio produzidos pela ação de α - e β -lapachona. Portanto, os compostos derivados de naftoquinonas se mostram promissores no controle de *T. gondii*.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

- Verificar a ação antiproliferativa dos compostos derivados de naftoquinonas (LQB94, LQB150 e LQB151) contra o parasita intracelular *Toxoplasma gondii*.

4.2. Objetivos específicos

- Verificar a viabilidade da célula LLC-MK2 tratada com os compostos LQB94, LQB150 ou LQB151.
- Verificar a toxicidade dos compostos LQB94, LQB150 e LQB151 contra o desenvolvimento intracelular do *T. gondii* em células LLC-MK2.
- Observar possíveis alterações estruturais e ultraestruturais dos parasitos e das célula LLC-MK2 após tratamento com os compostos LQB94, LQB150 e LQB151.

5. Material e Métodos

5.1. Cultivo de células da linhagem LLC-MK2

A linhagem de células LLC-MK2 (epitelial de rim de macaco *rhesus*) foi cultivada em garrafas de 25 cm² com *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). Para as infecções, as células foram plaqueadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços ou nas próprias garrafas de 25 cm² com DMEM suplementado com 5% de SFB.

5.2. Obtenção de *T. gondii*

Toxoplasma gondii, cepa RH, foi mantido por passagens de 2-3 dias na cavidade peritoneal de camundongos Swiss. A lavagem peritoneal foi realizada com solução de Hank's. A suspensão foi centrifugada a 1000g por 5 minutos a 4° C para remover debris de células e leucócitos peritoneais. O sobrenadante contendo os parasitos foi coletado e centrifugado novamente a 1000g por 10 minutos a 4° C. Os parasitos foram ressuspensos em DMEM e contados.

5.3. Derivado de naftoquinona

Os compostos derivado de naftoquinona utilizados foram sintetizados e cedidos pelo Dr. Chaquip D. Netto e colaboradores (Laboratório de Química Bioorgânica - LQB, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, Bloco H, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brasil).

Para estudos *in vitro*, os compostos LQB94, LQB150 e LQB151 foram diluídos em DMSO (dimetil sulfóxido) na concentração estoque de 118 mM. Alíquotas dos

compostos foram preparadas na concentração de 5 mM em DMEM (4,25% de DMSO final). As alíquotas foram mantidas em freezer (-20°C); os compostos foram testados nas seguintes concentrações: 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 µM. A preparação e manipulação dos compostos foram realizadas sem cuidados em relação à iluminação do ambiente, pois este não é sensível à luz.

5.4. Testes de viabilidade celular

Três técnicas foram usadas para checar a viabilidade das células LLC-MK2 após tratamento com os compostos: exclusão de brometo de etídio, redução do bromídeo 3-(4,5-Dimetil tiazol-2-il)-(2,5-difenil tetrazolio) (MTT) e dosagem de lactato desidrogenase (LDH).

Células LLC-MK2 cultivadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços foram incubadas com os compostos na concentração de 20 µM por 48 horas. Após esse tempo, lamínulas foram coletadas e invertidas em gotas de 10 µl da solução de brometo de etídio (10 µg/ml) em DMEM e a viabilidade das células avaliadas através de microscópio de fluorescência. Células mortas (núcleo vermelho intenso) e células vivas (núcleo laranja apagado) foram quantificadas. O brometo de etídio corresponde a um intercalante de DNA que é facilmente localizado em núcleo de células mortas devido à ausência da permeabilidade seletiva de suas membranas plasmáticas.

Para uma análise mais fina de viabilidade das células tratadas com a LQB151 realizamos a quantificação pelo ensaio colorimétrico que detecta a formação do lipídeo formazan em células encubadas com bromídeo MTT (MOSMANN, 1983; VAN MERLOO et al., 2011). A redução do MTT ocorre através de desidrogenases e de agentes redutores presentes nas células e quanto maior a produção de formazan maior a quantidade de células vivas (MOSMANN, 1983; VAN MERLOO et al., 2011). Portanto, 1×10^5 células da linhagem LLC-MK2 por poço em placas de 96 poços foram cultivadas com 150 µl de DMEM suplementado com 5% de SFB. Nas células tratadas foi adicionado ao DMEM o composto LQB151 em concentrações em diluição seriada iniciando em 0,2 µM até 100 µM. Após 24 horas, foi realizado o teste de viabilidade. Como parâmetro de máximo e mínimo de formação de formazan foi utilizado o controle positivo e negativo, respectivamente. Para o controle negativo as células foram permeabilizadas com 10 µl de triton X-100 a 10%. Foi adicionado em cada poço 15 µl de MTT (5mg/ml) por quatro horas, após o período de incubação o formazan foi solubilizado com 100 µl de DMSO. Após centrifugação da placa a 400g

por 7 minutos, 100 µl do sobrenadante foi coletado e transferido para uma nova placa de 96 poços, a leitura foi realizada . A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro de placa SoftMax Pro[®] 6.0 a 570 nm.

A dosagem de LDH foi realizada no sobrenadante de cultura das células LLC-MK2 usando o kit Doles[®]. Esse kit dosa a referida enzima que é da via glicolítica presente no citoplasma de células viáveis. A quantificação dessa enzima no sobrenadante de cultura de células é um indicativo da perda de permeabilidade seletiva das membranas plasmáticas das células cultivadas, consequência de um processo de morte celular (KOH & CHOI, 1987; LI & ZHANG, 1997). O cultivo de células na placa de 96 poços seguiu-se como para o ensaio de MTT. Aos poços tratados foram adicionados LQB151 ao DMEM suplementado com SFB, em concentrações provenientes de diluição seriada com a concentração máxima sendo 100 µM e a mínima sendo 3,2 µM. Após 24 horas, foi realizado o teste de viabilidade. Como parâmetro da concentração máxima e mínima foi utilizado o controle positivo e o negativo, respectivamente. O controle positivo correspondeu as células que foram permeabilizadas com 10 µl de triton a 10%. O controle negativo correspondeu à cultura saudável. Para a quantificação do LDH, 50 µl do sobrenadante dos poços tratados e dos controles foi retirado e transferidos para uma placa de 96 poços. Foi adicionados a esses poços 100 µl da solução A (6% de alúmen férrico 0,012M em 94% de solução de 0.1M de lactato, 0.005M de o-fenantrolina em Tris 0.2M pH8.8, a 37°C) por 3 minutos e 100 µl da solução B (5% de solução 3,73 mM de fenazina metassulfato/ 15,82mM de NAD em 95% de água destilada) por 5 minutos, todas as incubações ocorreram no escuro, a 37°C. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro de placa SoftMax Pro[®] 6.0 a 492 nm. Os dados foram plotados em gráficos pelo Microsoft Excel[®] 2007.

5.5. Interação *Toxoplasma gondii* com células LLC-MK2 e tratamento com compostos derivados de naftoquinona.

Após 24 horas de plaqueamento, como descrito no item 5.1, as células LLC-MK2 foram incubadas com *T. gondii*, na proporção de 3:1 protozoários por célula, por 2 horas. Após o término da incubação a placa foi lavada com solução Hank`s e foi adicionado DMEM suplementado com 5% de SFB com as diferentes concentrações de LQB94, LQB150 ou LQB151 (1; 2,5; 5 e 10 µM) . Após 24 e 48 horas de tratamento a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, as lamínulas redondas foram coletadas.

5.6. Preparo de células para avaliação da carga parasitária.

Células aderidas a laminulas foram coletadas, fixadas em formaldeído a 3% em tampão fosfato salino (PBS) e coradas com Giemsa (na diluição de 1 ml de Giemsa para 9 ml de água destilada) por 15 min. As lamínulas coradas foram lavadas com PBS e água destilada, e passadas na série acetona-xilol para desidratação. As lamínulas foram montadas em lâminas com Entellan[®]. A análise do possível desenvolvimento do *T. gondii* foi realizada através da contagem da carga parasitária em células tratadas ou não com os compostos no microscópio óptico de campo claro. A contagem foi realizada pela quantificação da carga parasitária de 100 células infectadas por lamínula, num total de três lamínulas por tipo de tratamento (LQB94, LQB150 ou LQB151), concentração do composto (1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 μM) e tempo de tratamento (24 e 48 horas). Os dados foram plotados no Microsoft Excel[®] 2007 e analisados estatisticamente pelo método *one-way* Anova seguido por Tukey. Através da cinética relatada acima foi realizado o gráfico de regressão não linear obtendo o IC₅₀ de *T. gondii*, os dados foram plotados e analisadas as médias de três valores pelo software Graphpad Prism[®] 6.

5.7. Detecção de glicoproteínas da parede cística de *Toxoplasma gondii* pela lectina de *Dolichus biflorus*

Para determinar se houve a conversão de taquizoítas a bradizoítas de *T. gondii* foi utilizado marcação com a lectina de *Dolichus biflorus* (ZHANG et al., 2001). Para tal, as células foram cultivadas e infectadas como descrito no item 5.1 e 5.6, respectivamente. Após os tratamentos com os compostos (item 5.6) as células foram lavadas, fixadas em PBS contendo 3% de formaldeído, lavadas em PBS e incubadas em 0,5% de Triton x-100 em PBS por 10 minutos. As células foram incubadas com 10 mM de cloreto de amônio em PBS por 30 minutos seguido de lavagem em PBS e incubação com 3% albumina sérica bovina em PBS (PBS-BSA). As células foram incubadas em anticorpo policlonal de camundongo contra *T. gondii* (1:5000) e lectina de *Dolichus biflorus* conjugada a FITC (10 $\mu\text{g/ml}$) em PBS-BSA, por 1h cada. As células foram lavadas com PBS e PBS-BSA antes da incubação com anticorpo secundário contra camundongo marcado com TRICT (1:400) em PBS-BSA. Ao final as lamínulas foram lavadas com PBS e montadas em ProLong Gold contendo DAPI. A observação do material foi realizada em microscópio Zeiss Axioplan equipado com contraste interferencial, iluminação epifluorescente e lâmpada de mercúrio HBO100.

Imagens foram capturadas com câmara digital AxioCam Mrc5 pelo sistema Axiovision da Zeiss.

5.8. Microscopia eletrônica de transmissão

As células analisadas por microscopia eletrônica de transmissão foram cultivadas em garrafas de 25 cm² (item 5.1) e infectadas com *T. gondii* na e tratadas com 5 µM dos compostos como o descrito no item 5.5. Após 48 horas de tratamento, as células infectadas contidas nas garrafas de cultura foram fixadas com gluteraldeído a 2,5% por 24 horas, lavadas e removidas mecanicamente através da ação de pequenos rodos de cultura de células. A solução de células foi centrifugada, pós-fixadas com 1% tetróxido de ósmio e 1% ferricianeto de potássio e desidratadas com solução de acetona em concentrações crescentes (30, 40, 50, 70 e 100%). Após esses processos as células foram infiltradas com solução de acetona e Epon (1:1, v:v), seguida de Epon puro após 8 horas e polimerizadas por 48 horas a 60° C. Para os cortes ultrafinos foram utilizados o ultramicrotômo Ultratrim Reichert. Os cortes foram coletados em grades de cobre e grades de ouro (para detecção de carboidratos pelo método de THIERRY, 1967 apud DE SOUZA, 2007). As grades de cobre foram posteriormente pós-contrastadas em temperatura ambiente com acetato de uranila e citrato de chumbo aquoso. As grades de ouro passaram pelo processamento de Thierry (item 5.9). O material foi examinado em microscópio eletrônico O material foi examinado em microscópio eletrônico FEI, modelo Tecnai Spirit operando a 120 KV.

5.9. Detecção de grânulos de amilopectina por Thierry

Grades de ouro contendo cortes ultra finos das células tratadas foram encubadas em solução de 1% de ácido periódico por 30 minutos e posteriormente lavadas. Em seguida, foram encubadas em solução de 1% tiosemicarbazida em 10% de ácido acético por 24 horas, lavadas nas soluções de ácido acético de 10%, de 5% e de 2% e, por ultimo em água destilada. As grades secas foram observadas no microscópio eletrônico de transmissão.

6. Resultados

A verificação da citotoxicidade dos compostos com relação à célula hospedeira foi analisada por meio de detecção de núcleos contendo o intercalante de DNA brometo de etídio que emite fluorescência vermelho intenso, quando estimulado por um feixe de luz de comprimento entre 500nm (ultravioleta). As células tratadas com

os compostos LQB94, LQB150 ou LQB151 na concentração de 20 μM e incubadas com brometo de etídio (figura 1B-D) não mostraram marcação diferenciada do controle (figura 1A). O controle possui uma taxa de morte celular esperada, poucas células marcadas de vermelho intenso (figura 1A). O resultado da análise de morte celular detectável por este método permitiu o prosseguimento das análises seguintes.

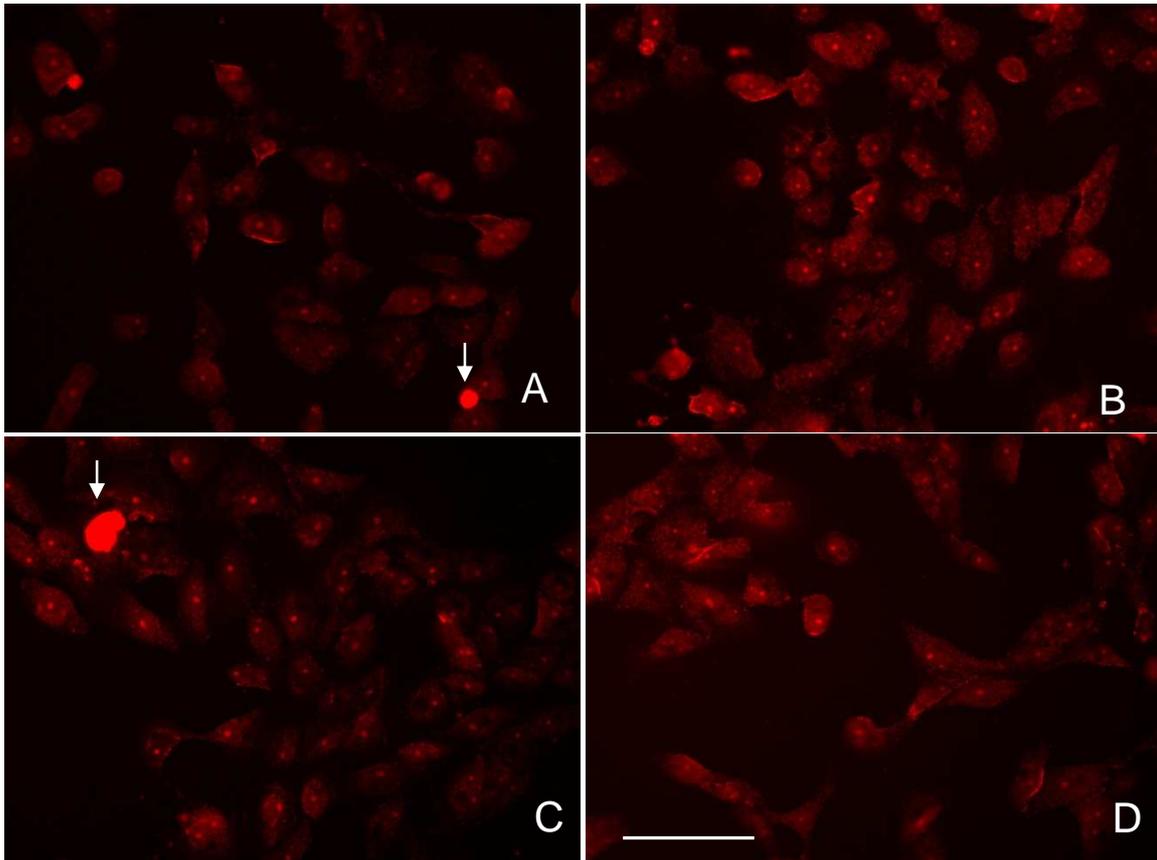


Figura 1. Imagem de células LLC-MK2 tratadas ou não com LQB94, LQB150 ou LQB151 na concentração de 20 μM por 48 horas marcadas com brometo de etídio para análise de viabilidade celular. A) controle; B) LQB94; C) LQB150 e D) LQB151. Setas indicam células mortas. Barra=100 μm .

A análise da cinética de desenvolvimento de *T. gondii* em células infectadas tratadas com os compostos LQB94, LQB150 ou LQB151 mostrou redução significativa da carga parasitária em todas as concentrações estudadas, nos tempos de 24 e 48 horas, comparados aos controles não tratados. Na concentração de 1 μM , já se observa redução de 35% do crescimento do *T. gondii* para LQB94, 42% para LQB150 e 71% para LQB151, no período de 48 horas de tratamento comparado ao controle de mesmo tempo. Avançando para maiores concentrações, a redução aumenta gradualmente (Figura 2 e 4).

O composto LQB94, em 48 horas de tratamento com relação ao seu controle, induziu redução de 47, 68 e 73% nas concentrações de 2,5; 5,0 e 10,0 μM , respectivamente (Figura 4). O composto LQB150 induziu redução de 49, 56 e 64%, nas respectivas concentrações citadas acima (Figura 4). Finalmente a LQB151, que mostrou maior capacidade de inibição de crescimento do parasito, induziu 73% de redução da carga parasitária na concentração de 2,5 μM e 80% nas concentrações de 5,0 e 10,0 μM (Figura 4). Dos três compostos analisados, o LQB151 exibiu controle mais eficaz dos parasitos. Nas concentrações de 2,5; 5,0 e 10,0 μM a infecção de células tratadas com a LQB151 não exibiu aumento significativo da carga parasitária entre 24 e 48 horas (Figura 2).

Os valores de IC_{50} foram calculados após o tratamento de células infectadas pelo parasito com os compostos pelo período de 24 e 48 horas, respectivamente, e obteve-se: acima de 10 μM e $2,37 \mu\text{M} \pm 1,06$ para LQB94; $4,33 \mu\text{M} \pm 1,15$ e $2,61 \mu\text{M} \pm 1,09$ para LQB150; $4,15 \mu\text{M} \pm 1,13$ para LQB151 no tempo de 24 horas (Figura 3 e 4), não foi possível determinar o valor de IC_{50} da LQB151 no tempo de 48 horas, pois haveria a necessidade de testar concentrações menores que 1 μM . O IC_{50} no tempo de 48 horas é reduzido com relação ao IC_{50} do tempo de 24 horas. Indicativo que os compostos têm melhor resposta ao longo prazo (Figura 2).

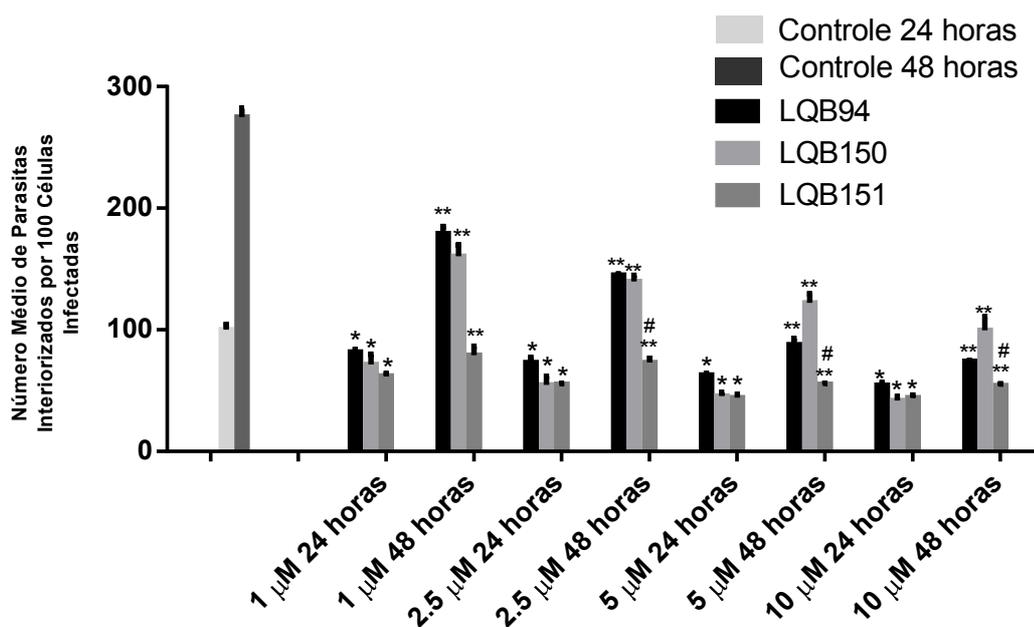


Figura 2. Cinética de tratamento dos compostos LQB94, LQB150 e LQB151 comparado com os controles não tratados em células LLC-MK2 infectadas com *Toxoplasma gondii* por 24 e 48 horas. *Significativo com relação ao controle 24 horas. **Significativo com relação ao

controle 48 horas. # Valor estatisticamente não significativo em comparação ao valor de 24 horas com a mesma concentração.

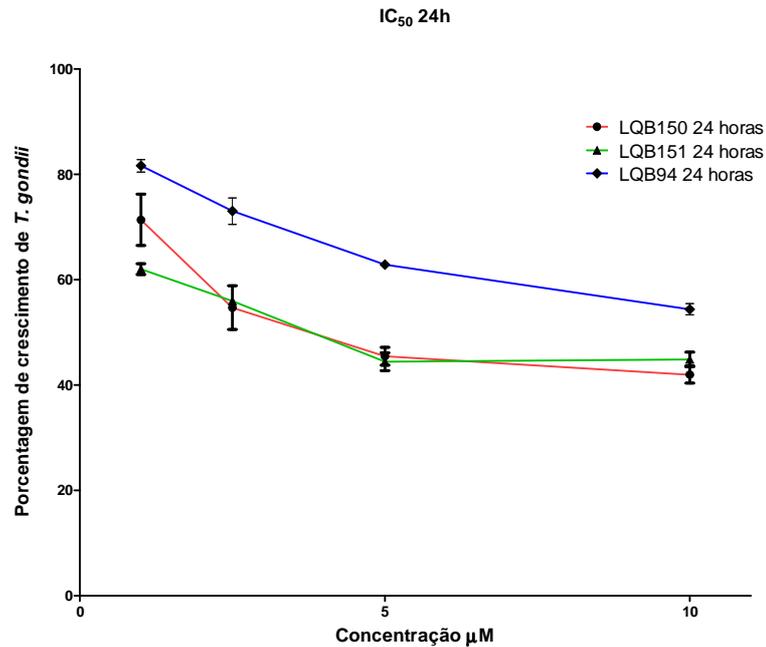


Figura 3. Porcentagem de crescimento de *Toxoplasma gondii* em células LLC-MK2 tratadas com LQB94, LQB150 ou LQB151 por 24 horas.

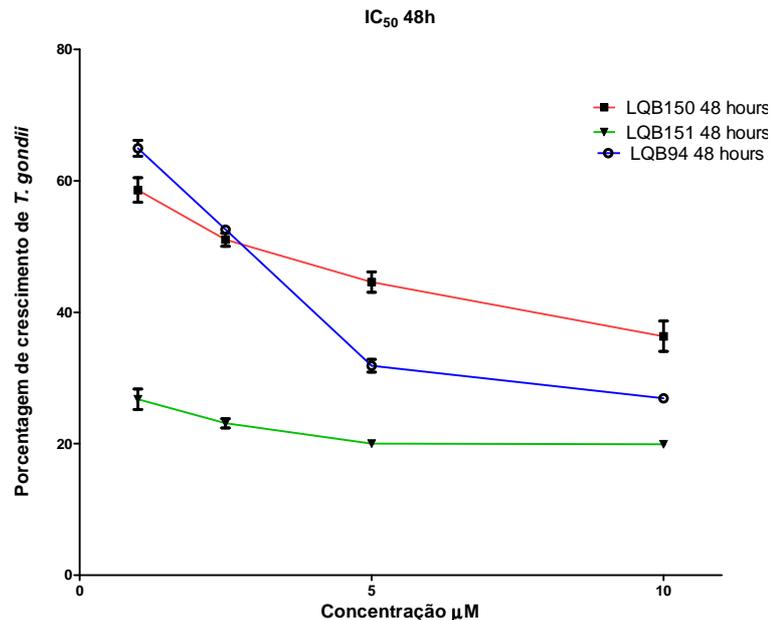


Figura 4. Porcentagem de de crescimento de *Toxoplasma gondii* em células LLC-MK2 tratadas com LQB94, LQB150 ou LQB151 por 48 horas.

Concomitantemente a diminuição da carga parasitária no período de 48 horas de tratamento com todos os compostos nas concentrações utilizadas em relação aos controles de mesmo tempo foram observadas nas células coradas com Giemsa. Essas tinham geometria oval a circular, borda extremamente corada, parasitos de tamanho reduzido e aglomerados (figura 5B-G), distintas das rosáceas típicas observadas dentro das células infectadas não tratadas (figura 6A).

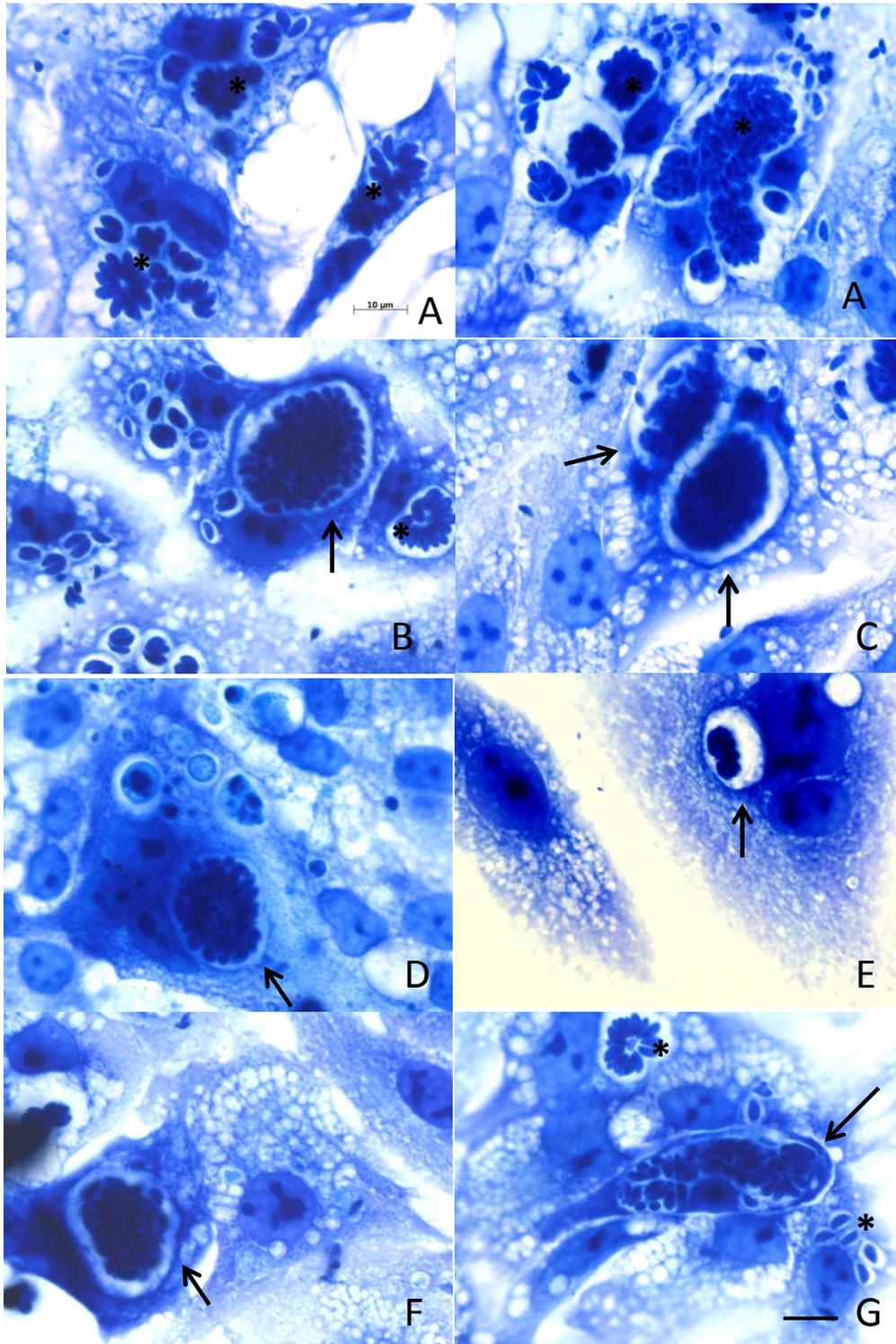


Figura 5. Imagens de células LLC-MK2 infectadas com *Toxoplasma gondii*, tratadas ou não com LQB94, LQB150 ou LQB151 no período de 48 horas, coradas com Giemsa. (A) controle; (B) LQB94 2,5 μ M; (C) LQB94 10 μ M; (D) LQB150 2,5 μ M; (E) LQB151 2,5 μ M; (F) LQB151 2,5 μ M; (G) LQB151 10 μ M. Observam-se estruturas semelhantes a cistos teciduais (setas) e taquizoítas (asterisco). Barras = 10 μ m.

Através de marcação de N-acetilgalactosamina, um dos carboidratos presentes na parede cística de *T. gondii* (ZHANG et al., 2001), com a lectina de *Dolichos*

biflorus, foi comprovada a formação de cistos teciduais contendo bradizoítas de *T. gondii* em cultura de células tratadas com 10 μM dos compostos por 48 horas (figura 6). A marcação identificou cistos maiores em células infectadas e tratadas com LQB151 (Figura 6I-L). A LQB151 foi o único composto a induzir a formação de parede cística a 5 μM (dados não mostrados).

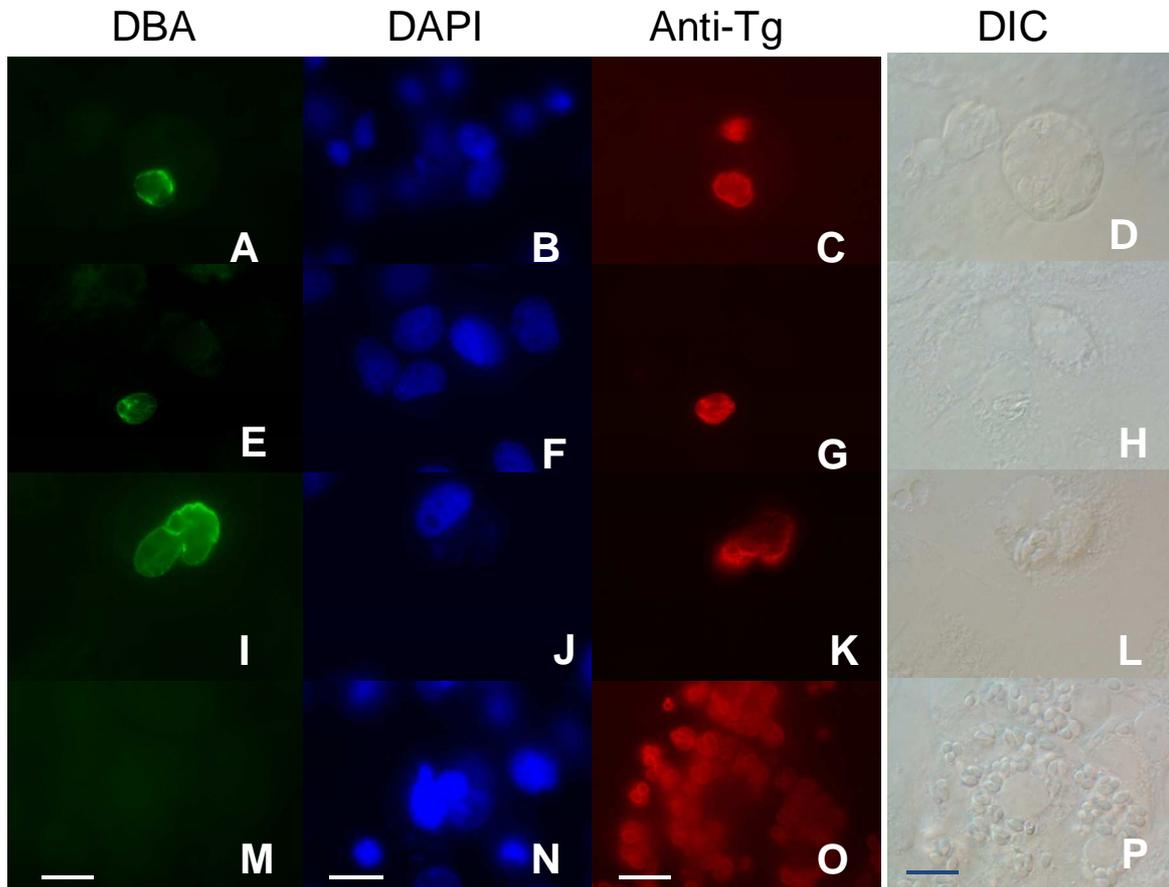


Figura 6. Imagens de microscopia de fluorescência e de contraste interferencial (DIC) de células LLCMK2 infectada com taquizoítas de *Toxoplasma gondii* tratadas por 48 horas ou não com compostos (10 μM), marcadas com *Dolichos biflorus* (DBA) que reconhece parede de cistos do parasito; DAPI (DAPI), que reconhece DNA; e anticorpo anti-*T. gondii* (Anti-Tg). (A-D) Células tratadas com o composto LQB94; (E-H) Células tratadas com o composto LQB150; (I-L) Células tratadas com o composto LQB151; (M-P) Células não tratadas com composto algum. (DBA) Lectina *Dolichos biflorus*, (anti-tg), (DIC) contraste. Barras = 50 μm

A indução de bradizoítas de *T. gondii* após o tratamento com os compostos foi também confirmada por análise ultraestrutural. Aumento de grânulos de amilopectina e a posição do núcleo na região posterior do parasito são marcadores ultraestruturais de bradizoítas (DUBEY et al., 1998). A análise das células tratadas com os três compostos mostrou a presença de grânulos de amilopectina nos parasitos intracelulares (figura 7A-F) em relação a parasitos de células não tratadas (figura 7G). Em alguns tratamentos foram identificados a presença de estruturas

deformadas nos parasitos, como protuberâncias (figura 7 A-D) ou reentrâncias (figura 7E e F). Alguns parasitos estavam em processo inicial de degradação (figura 7C e D). A presença dos grânulos de amilopectina foi confirmada pelo método do THIERRY (1967), que detecta carboidratos, deixando os grânulos de amilopectina eletrondensos confirmando a conversão a bradizoítas (figura 7H).

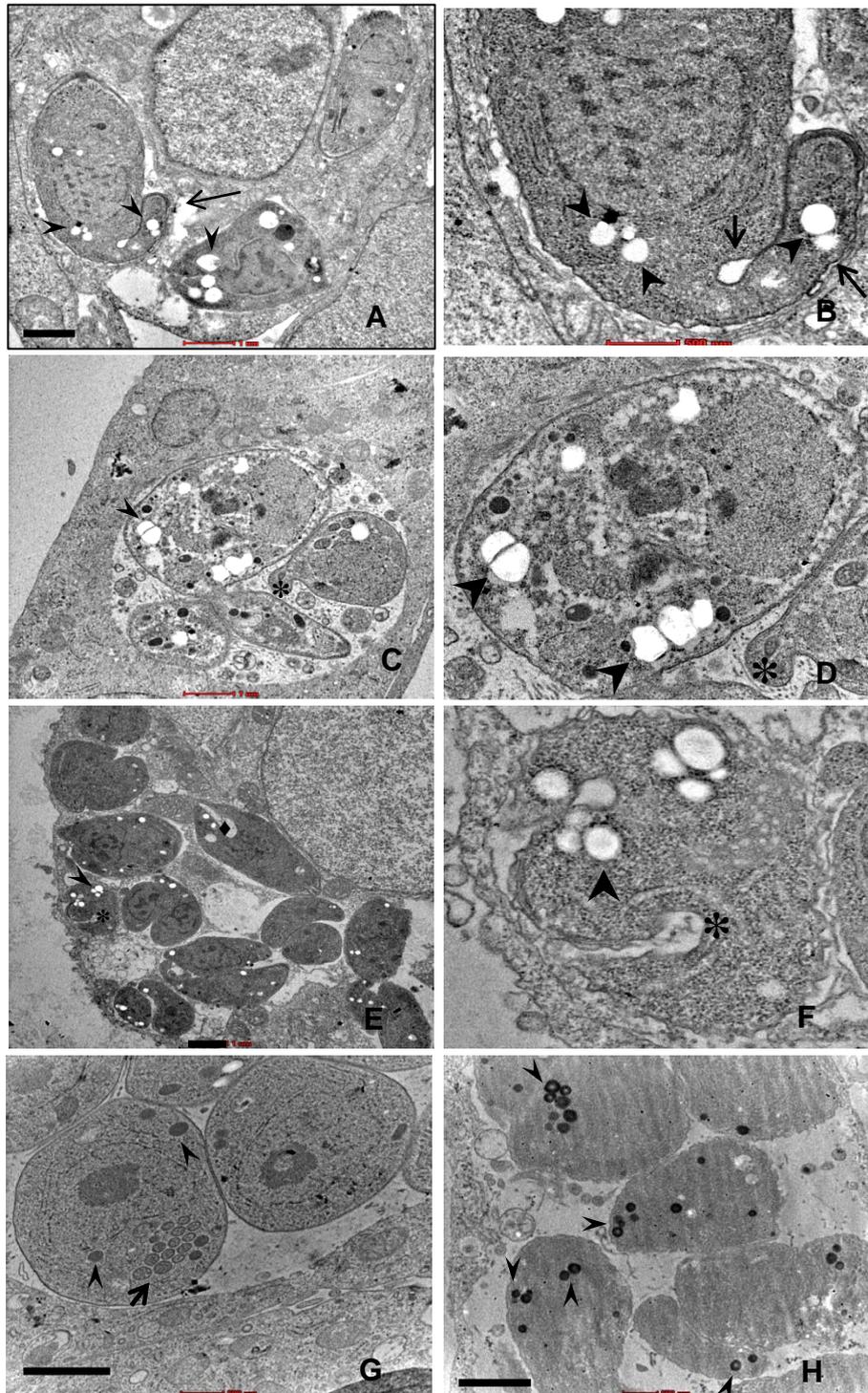


Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células LLC-MK2 infectadas com *Toxoplasma gondii* tratadas ou não com os compostos na concentração de 10 μ M por 48 horas. (A) Células tratadas com LQB94 apresentaram deformação estrutural (seta) e grânulos de amilopectina (cabeça de seta); (B) Maior aumento de parte da imagem “A” mostrando a deformação estrutural (setas) e grânulos de amilopectina (cabeça de seta). (C) Células tratada com LQB150 apresentaram parasito com aspecto digerido (*) e grânulos de amilopectina (cabeça de seta); (D) Maior aumento de parte da imagem “C” mostrando extração citoplasmática (♦), grânulos de amilopectina (cabeça de seta) e deformação da estrutura do parasita (*). (E) Células tratadas com LQB151 mostrando parasito com alteração na membrana plasmática (*) e grânulos de amilopectina (cabeça de seta); (F) Maior aumento de parte da imagem “E” mostrando o parasito com alteração na membrana

plasmática (*) e com presença de grânulos de amilopectina (cabeça de seta); (G) Células não tratadas apresentando parasitos com aspecto normal, mitocôndrias (seta) e grânulos densos (cabeça de seta); (H) Células tratadas com LQB151 após o método de detecção de carboidratos confirmando que grânulos de amilopectina (cabeça de seta) são induzidos pelo tratamento com os compostos; essa é uma figura representativa, pois o tratamento com os outros compostos induzem grânulos de amilopectina visualizados pelo método de Thierry. Somente a imagem “H” é de células processadas pelo método do Thiery, as outras foram tratadas de forma rotineira. Barras = 1 μm para A, C, D, E e F, e 500 μm para B, G e H.

Tendo encontrado o composto de melhor ação antiparasitária, LQB151, realizamos duas análises mais precisa da viabilidade das células LLC-MK2 após tratamento. Para isso, foi realizado o ensaio de MTT, no qual é detectado o produto da reação de redução deste reagente, e do LDH, que avalia a liberação dessa enzima no sobrenadante da cultura, em células tratadas com LQB151 em diferentes concentrações (Figura 8 e 9). Na maior concentração de tratamento a viabilidade média das células foi acima de 80% pelo MTT (Figura 8). O ensaio de LDH mostrou liberação de 20% a mais do que o controle (Figura 9).

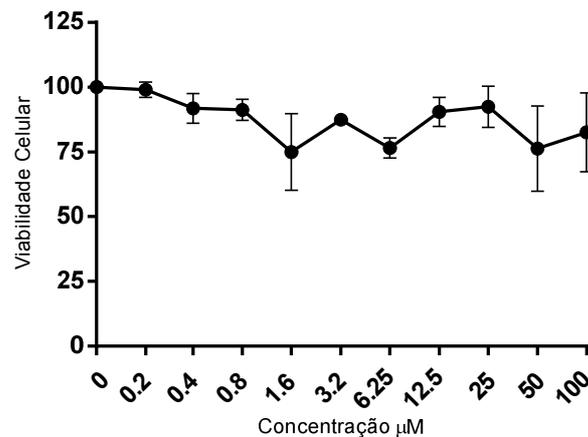


Figura 8. Análise da viabilidade celular pela formação de formazan em células encubadas com MTT, tratadas com LQB151 em distintas concentrações por 24 horas. Note que não houve grandes alterações da viabilidade celular com o aumento da concentração do composto.

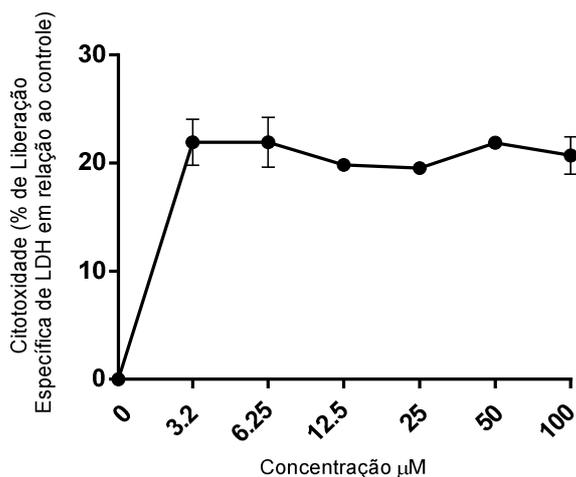


Figura 9. Análise da viabilidade celular pela detecção de liberação de LDH do sobrenadante de células tratadas com LQB151 em distintas concentrações por 24 horas. Note aumento na liberação da LDH que não alterou com o aumento da concentração do composto.

7. Discussão

Os três compostos analisados mostraram pouca toxicidade às células hospedeiras. Além disso, esses compostos foram eficientes em reduzir a carga parasitária de células infectadas com *T. gondii*, esses resultados são um indicativo da ação seletiva dos compostos com relação ao parasito. O composto eleito foi o LQB151, pois inibiu o desenvolvimento *in vitro* da infecção a partir de 2,5 μM , observado através do número similar de parasitos interiorizados nas células com tratamento de 24 e 48 horas.

Compostos quinoídicos, que possuem o grupo para-quinona, são responsáveis por produzirem ROS por agir como um substrato para NADPH oxidase (BOLTON et al., 2000). Esses ROS são responsáveis por peroxidação de lipídeos nos parasitos, por danos ao material genético de células e parasitos e por alterações na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria levando a inibição da respiração celular (VALKO et al., 2004). Entretanto, este tipo de mecanismo de ação atua mais sobre alguns microorganismos patogênicos, como os tripanossomatídeos *Critidia fasciculata* e *Leptomonas seymouri*, do que sobre células hospedeiras; esses microorganismos parecem ser muito mais suscetíveis ao estresse oxidativo (MOLINA et al., 1996). No nosso trabalho, foi demonstrada a mesma susceptibilidade de *T. gondii* aos danos causados pelos possíveis efeitos oxidativos dos compostos quinoídicos estudados e baixa toxicidade contra a linhagem de células hospedeiras LLC-MK2. Outros trabalhos, envolvendo derivados de

naftoquinonas, mostram o mesmo perfil de baixa toxicidade em experimentos *in vitro* de células hospedeiras, no caso de células parasitadas, e de células normais, utilizando tratamento de células tumorais (DA SILVA et al., 2009; NETTO et al., 2010). Por exemplo, o composto LQB94 possui concentração inibitória do crescimento da metade dos linfócitos murinos (IC_{50}) de $72,3 \mu M \pm 2,2$ o que é 3,7 vezes maior que o IC_{50} para células de carcinoma mamário humano MCF-7 ($19,3 \mu M \pm 7,1$), maior 3,6 vezes do IC_{50} para *Leishmania amazonensis* ($32,9 \mu M \pm 0,35$) e maior 258,2 vezes que o IC_{50} para *Plasmodium falciparum* ($0,28 \mu M \pm 0,13$) (DA SILVA et al., 2009). Os compostos LQB150 e LQB151 têm IC_{50} para células mononucleares do sangue periférico ativadas com hemaglutinina A de $20,0 \mu M$, enquanto que o IC_{50} para linhagem de células de leucemia K562 é $6,8 \mu M$ e $5,7 \mu M$, respectivamente; e o IC_{50} da linhagem de leucemia HL-60 é de $4,87 \mu M$ para ambos compostos (NETTO et al., 2010). Os dados destes grupos somados aos resultados desse trabalho mostram o potencial destes compostos em estudos *in vivo* utilizando animais de laboratório. Considerando que o IC_{50} do tratamento de células infectadas com *T. gondii* com algumas sulfanamidas por 72 horas, como sulfadiazina, sulfametaxazole e sulfisoxazole e de pirimetamina pelo período de tratamento de 72 horas é de $9,9 \mu M$; $4,3 \mu M$; $23,9 \mu M$ e 160 nM , respectivamente (DEROUIN & CHASTANG, 1989), o IC_{50} dos compostos testados nesse trabalho mostraram valores promissores com relação aos quimioterápicos convencionais, em torno de $2 \mu M$ para LQB94 e LQB150, e menor que $1 \mu M$ para LQB151, no período de tratamento de 48 horas. É provável que o IC_{50} da LQB151 atinja concentração em nanomolar, sugerindo melhor ação seletiva contra o parasito. Contudo, seria necessário que mais análises experimentais fossem realizadas para certificar a potência da LQB151 com relação aos demais quimioterápicos utilizados na clínica, experimentos em que o tempo de tratamento fosse prolongado a 72 horas ou mais, e utilizasse concentrações menores que $1 \mu M$.

Tem sido demonstrado que a infecção do *T. gondii* é resistente a ROS produzida por células do sistema imune ativadas (ALEXANDER et al., 1997). Isso indica que o mecanismo de ação (aumento geração de ROS) dos compostos derivados de naftoquinonas não é promissor no controle da infecção *in vitro* de *T. gondii*. Entretanto, SHRESTA et al. (2006) mostram que a infecção *in vivo* de *T. gondii* em macrófagos murinos está correlacionada com a produção de ROS. Foi demonstrado que existe uma subpopulação de macrófago que é ativada adquirindo função

toxoplásmicas, dependentes de ROS, durante a infecção ou por períodos de tempo curtos após infecção. Outra subpopulação de macrófago é infectada antes de se tornar ativada, mas ainda assim é capaz de produzir alguma quantidade de ROS; essa subpopulação apresenta alguma atividade toxoplásmica, atuando por um curto período de tempo (1 hora) após a infecção. SHRESTA et al. (2006) discute-se que *T. gondii* evade o mecanismo de produção de ROS como uma estratégia de proliferação, portanto, ROS pode ser considerado um fator importante para o controle da infecção do parasito. O mecanismo pelo qual *T. gondii* é capaz de controlar a produção de ROS ainda não foi elucidado, contudo acredita-se que ele seja capaz de modular a ação da enzima NADPH oxidase em macrófagos ativados além de possuir enzimas antioxidantes presentes no taquizoíta, como a SOD e a CAT (CARVALHO & DE SOUZA, 1989; SON et al., 2001; ODBERG-FERRAGUT et al., 2000; KWOK et al., 2004). Além disso, *T. gondii* é capaz de modular a resposta inflamatória proveniente do primeiro sinal que corresponde ao reconhecimento de IFN- γ responsável por induzir a produção de ROS (MURRAY et al., 1985). Em suma, apesar do *T. gondii* atuar reduzindo a produção de ROS, esse agente microbicida é importante no seu controle como mostrado por SHRESTA et al. (2006).

Os compostos estudados aqui agem na enzima NADPH quinona oxireductase (NQO1), já demonstrando na sua ação contra células de leucemia K562 que expressam altos níveis da NQO1 (PINK et al., 2000; NETTO et al., 2010). Uma das explicações para a ação dos compostos sobre a infecção *in vitro* de *T. gondii* pode ser justamente a redução desses compostos desencadeando o processo de estresse oxidativo, via a enzima NQO1. Outra questão em aberto é o nível de antioxidantes de taquizoítas de *T. gondii*, entretanto o que determina o dano às estruturas celulares é que o nível de estresse oxidativo supere o nível de enzimas antioxidantes (AUTEN & DAVIS, 2009), o desequilíbrio desses fatores é crucial para a ação das ROS sob, principalmente, os parasitos que parecem ser mais suscetíveis a ROS do que as células hospedeiras (DA SILVA & DE SOUZA, 2002; MOLINA et al., 1996).

Neste trabalho os compostos derivados de naftoquinona também mostraram ser capazes de converter taquizoítas a bradizoítas, efeito visto também com outros compostos derivados de naftoquinonas por PORTES et al. (2012). É provável que ROS tenha induzido conversão de taquizoítas a bradizoítas pela intercalação de DNA provocada por ROS, interrompendo o ciclo celular do taquizoíta em pontos de

checagem, pois a redução da rapidez do ciclo celular é uma das razões pelas qual o taquizoíta entra em processo de diferenciação a bradizoíta (AUTEN et al., 2002; DALLE-DONNE et al., 2003; JEROME et al., 1998; RADKE & WHITE, 1998). Esses efeitos foram primeiro visualizados através de células infectadas com *T. gondii*, tratadas com o composto e coradas com Giemsa, em que foram observadas estruturas semelhantes a cistos, com a borda do vacúolo parasitóforo espessamente coradas. Esse resultado foi confirmado com a marcação de glicoproteína da parede cística pela lectina de *Dolichus biflorus*, pelo método de detecção de grânulos de amilopectina pelo método de THIERRY (1967) apud DE SOUZA (2007) e pela análise de posição do núcleo demonstrado ser posterior nas imagens de microscopia eletrônica de transmissão (DUBEY et al., 1998).

Através da imagem de microscopia eletrônica de transmissão também puderam ser visualizados parasitos com ultraestrutura danificada aparentando alteração da membrana plasmática. Os danos podem ser resultado da ação de ROS na peroxidação de lipídeos (AUTEN et al., 2002; DALLE-DONNE et al., 2003).

Esses resultados demonstram os efeitos antiproliferativos desses compostos que são promissores para avanço em estudos *in vivo* em camundongos infectados com *T. gondii* com administração combinada ou não com outros quimioterápicos utilizados em pacientes com toxoplasmose. Essa abordagem é utilizada por outros grupos. FERREIRA et al. (2006) realizou estudo *in vivo* usando um composto denominado PHNQ6, uma hidroxinaftoquinona, semelhante ao estudado neste trabalho que mostra nenhum efeito tóxico a camundongos durante tratamento de um mês. Os camundongos apresentaram histologia normal do fígado, ausência de perda de peso e de letargia. A combinação de sulfadiazina e de PHNQ6 aumentou a sobrevivência dos camundongos que haviam sido infectados oralmente por cistos teciduais de *T. gondii* cepa P, mostrando diminuição de cistos teciduais e danos aos bradizoítas observados. O tratamento combinado de camundongos infectados com *T. gondii* com esse composto associado à sulfadiazina auxiliou na diminuição da dose do segundo composto e, conseqüentemente, a diminuição de efeitos colaterais (FERREIRA et al., 2006). Portanto, a estratégia adotada no referido trabalho é uma alternativa interessante para testar o LQB151 *in vivo*.

8. Conclusão

Os compostos estudados reduziram a carga parasitária de células infectadas com *T. gondii*, foram capazes de convertê-los para sua forma de replicação lenta e danificá-los irreversivelmente mesmo após conversão. Esses resultados mostram que esses compostos são promissores ao prosseguimento das análises, permitindo avançar em experimentos que elucidem o real envolvimento da ROS nesse mecanismo e no tratamento isolado ou combinado com outros quimioterápicos já prescritos, como sulfadiazina, *in vivo* com camundongos infectados. Essas análises são essenciais para a possibilidade de usar esses compostos no tratamento de seres humanos.

9. Bibliografia

- Achbarou A., Mercereau-Puijalon O., Sadak A., Fortier B., Leriche M. A., Camus D., Dubremetz J. F. Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology* 1991; 103: 321–329.
- Alexander J., Scharon-Kersten T. M., Yap G., Roberts C. W., Liew F. Y., Sher A. Mechanisms of innate resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 1997; 352: 1355–1359.
- Ambroise-Thomas P., Pelloux H. Toxoplasmosis-congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitology Today* 1993; 9: 61-63.
- Appelberg R. Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms. *The Journal of Leukocyte Biology* 2006; 79: 1117-1128.
- Auten R. L., Whorton M. H., Nicholas Mason S. Blocking Neutrophil influx induces DNA damage in hyperoxia- exposed new born rat lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2002; 26:391-397.
- Ajzenberg D., Bañuls A. L., Su C., Dumètre A., Demar M., Carme B., Dardé M. L. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *The International Journal of Parasitology* 2004; 34: 1185-1196.
- Andrade R. M., Wessendarp M., Gubbels M. J., Striepen B., Subauste C. S. CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *The Journal of Clinical Investigation* 2006; 116: 2366-77.
- Austin F. G., Schistosoma mansoni chemoprophylaxis with dietary lapachol. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1974; 23: 412-419.
- Authen R. L., Davis J. M. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatric Research* 2009; 66: 121-127.
- Bahia-Oliveira L. M., Jones J. L., Azevedo-Silva J., Alves C. C., Orefice F., Addiss D. G., Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerging Infectious Diseases Journal* 2003; 9:55-62.
- Barragan A., Sibley L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends in Microbiology* 2003; 11:426-430.

- Barragan A., Sibley L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. *The Journal of Experimental Medicine* 2002; 195:1625-1633.
- Bayer T. V., Svezhova N. V., Radchenko A. I., Sidorenko N. V. Parasitophorous vacuole: morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short inside into the problem). *Cell Biology International* 2002; 26:861-871.
- Bedard K., Krause K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews* 2007; 87: 245-313.
- Beckers C. J. M., Dubremetz J. F., Mercereau-Puijalon O., Joiner K. A. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *The Journal of Cell Biology* 1994; 127:947-961.
- Behnke M. S., Khan A., Wootton J. C., Dubey J. P., Tang K., Sibley L. D. Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 2011; 108: 9631-9636.
- Bliss S. K., Zhang Y., Denkers E. Y. Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high levels production of IFN- γ -independent IL-12. *The Journal of Immunology* 1999; 163:2081-2088.
- Bradley P. J., Li N., Boothroyd J. C. A GFP-based motif-trap reveals a novel mechanism of targeting for the *Toxoplasma* ROP4 protein. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2004; 137: 111-120.
- Bohne W., Heesemann J., Gross U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infection and Immunity* 1993; 61:1141-1145.
- Bohne W., Heesemann J., Gross U. Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infection and Immunity* 1994; 62:1761-1767.
- Bohne W., Roos D. S. Stage-specific expression of a selectable marker in *Toxoplasma gondii* permits selective inhibition of either tachyzoites or bradyzoites. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1997; 88:115:128.
- Bolton J. L., Trush M. A., Penning T. M., Dryhurst G., Monks T. J. Role of quinines in toxicology. *Chemical Research in Toxicology* 2000; 13: 135-160.
- Boothroyd J. C., Black M., Bonnefoy S., Hehl A., Knoll L. J., Manger I. D., Ortega-Barria E., Tomavo S. Genetic and biochemical analysis of development in *Toxoplasma gondii*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 1997; 352: 1347-1354.
- Boyd M., Mckee T. C., Bokesch H. R., McCormick J. L., Rashid M. A., Spielvogel D., Gustafson K. R., Alavanja M. M., Cardellina J. H., Isolation and characterization of new anti-HIV and cytotoxic leads from plants, marine, and microbial organisms. *Journal of Natural Products* 1997; 60:431-438.
- Cadena E., Biochemistry of Oxigen. *Annual Review of Oxigen Toxicity* 1989; 58:79-110.
- Cammarer S. B., Jimenez C., Jones S., Gros L., Lorente S. O., Rodrigues C., Rodrigues J. C. F., Caldera A., Perez L. M. R., De Souza W., Kaiser M., Brun R., Urbina J. A., Pacanowska D. G., Gilbert I. H., Quinuclidine derivatives as potential antiparasitics. *Antimicrob. Agents Chemother* Antimicrob. Agents. Chemother. 2007. 51: 4049-4061.
- Carme B., Bissuel F., Ajzenberg D., Bouyne R., Aznar C., Demar M., Bichat S., Louvel D., Bourbigot A. M., Peneau C., Neron P., Dardé M. L. Severe acquired

- toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40:4037–4044.
- Carruthers V. B., Giddings O. K., Sibley L. D. Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cellular Microbiology* 1999; 1: 225–236.
- Carruthers V. B., Sherman G. D., Sibley L. D. The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275:14346–14353.
- Carruthers V. B., Sibley L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *European Journal of Cell Biology* 1997; 73:114-123.
- Cart A., Tindall B., Brew B. J., Marriott D. J., Harkness J. L., Penny R., Cooper D. A. Low-dose trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Annals of Internal Medicine* 1992; 117:106-111.
- Carvalho L., De Souza W. Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during interiorization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *Journal of Protozoology* 1989; 36:164-170.
- Carvalho L. H., Rocha E. M. M., Raslan D. S., Oliveira A. B., Krettli A. U. *In vitro* activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1988; 21, 485-487.
- Cesbron-Delauw M. F. Dense granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitology Today Journal* 1994; 10: 293–296.
- Charif H., Darcy F., Torpier G., Cesbron-Delauw M. F., Capron A. *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *The Journal of Experimental Parasitology* 1990; 71: 114–124.
- Charron A. J., Sibley L. D. Host Cells: mobilized lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science* 2002; 115:3049-3059.
- Chaudhuri S. K., Huang L., Fullas F., Brown D. M., Wani M. C., Wall M. E., Isolation and structure identification of an active DNA strand-scission agent, (+)-3,4-dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan. *Journal of Natural Products* 1995; 58:1966-1969.
- Chen Y.; Hu L. Design of anticancer prodrugs for reductive activation. *Medical Care Research and Review* 2009; 29: 29-64.
- Cheron G., Saint-Raymond A., Castot A. Toxoplasmose congénitale convulsions et surdosage en pyriméthamine. *Archives Françaises de Pédiatrie* 1987; 44:824.
- Chilpa R. R., Estrada M. J. Química de las plantas alexiteras. *Interciencia* 1995; 20:257-263.
- Da Silva A. J. M., Netto C. D., Lima W.-P., Torres-Santos E. C., Bergamann B. R., Maurel S., Valentin A., Costa R. R. P. Antitumoral, Antileishmanial na Antimalarial Activity of Pentacyclic 1-4, naftoquinone Derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2009; 20: 176-182.
- Da Silva M. N., Ferreira V. F., De Souza C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e seus derivados. *Química Nova* 2003; 26: 407-413.
- Dalle-Donne I., Giustarini D., Colombo R., Rossi R., Milzani A. Protein carbonilation in human disease. *Trends in Molecular Medicine* 2003; 9:169-176.
- Daudon M., Jungers P., Drug-induced renal calculi: epidemiology, prevention and management. *Drugs* 2004; 64:245-275.
- Demar M., Ajzenberg D., Maubon D., Djossou F., Panchoe D., Punwasi W., Valery N., Peneau C., Daigre J. L., Aznar C., Cottrelle B., Terzan L., Dardé M. L., Carne

- B. Fatal outbreak of human toxoplasmosis along the Maroni River: epidemiological, clinical, and parasitological aspects. *Clinical Infectious Disease* 2007; 45: e88–e95.
- De Moura L., Bahia-Oliveira L. M. G., Wada M. Y., Jones J. L., Tuboi S. H., Carmo E. H., Ramalho W. M., Camargo N. J., Trevisan R., Graça R. M. T., da Silva A. J., Moura I., Dubey J. P., Garrett D. O. Waterborne outbreak of toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerging Infectious Disease* 2006.;12, 326–329.
- De Melo E. J. T., De Souza W. A Cytochemistry study of the inner membrane complex of the pellicle of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research* 1997; 83:252-256.
- De Groote M. A., Fang F. C. NO inhibitions: antimicrobial properties on nitric oxide. *The Journal of Clinical Infection Disease* 1995; 21:S162-S165.
- Derouin F., Chastang C. In Vitro Effects of Folate Inhibitors on *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1989 ;33 :1753-1759
- Desmots G., Couvreur J., Alison F., Baudelot J., Gerbeaux J., Lelong M. Etude épidémiologique sur la toxoplasmose: de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. *Revue Française d'Etudes Cliniques et Biologiques* 1965; 10: 952-958.
- De Souza W., Chagas M. C. Mise en évidence et structure du système microtubulaire de *Toxoplasma gondii*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences series D* 1972; 275:2899-2901.
- De Souza W., Duarte E. S. M., Urbina J. A., Vommaro R. C., Antiproliferative activities of two novel quinuclidine inhibitors against *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*. *Antimicrob. Chemother.* 2006 58:59:65.
- De Souza W., Souto-Pradón T. Ultrastructure localization of basic protein on the conoid, rhoptries and micronemes of *Toxoplasma gondii*. *Zeitschrift fur Parasitenkunde* 1978; 56:123-129.
- De Souza W., Citoquímica de Carboidratos. In: De Souza W. (ed.) Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas as ciências biológicas. 2ª ed. Rio de Janeiro: *Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise* 2007; 117-125.
- Dibbern D., Montanaro A., Allergies to sulfonamide antibiotics and sulfur-containing drugs. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2008; 100:91-100.
- Dobbin C. A., Smith N. C., Johnson A. M. Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine *Toxoplasma* infection via immunomodulation of NF-κB and nitric oxide. *The Journal of immunology* 2002; 169: 958-965.
- Dubey J. P. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 1997; 44:592-602.
- Dubey, J.P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *International Journal for Parasitology* 1996; 82, 957–960.
- Dubey J. P., Frenkel J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *Journal of Protozoology* 1972; 155-177.
- Dubey J. P., Frenkel J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *Journal of Protozoology* 1976; 23:532-547.
- 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* 1998; 11: 267-299.
- Dubey, J.P., Lunney, J.K., Shen, S.K., Kwok, O.C.H., Ashford, D.A., Thulliez, P., Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *International Journal for Parasitology* 1996; 82, 438–443.

- Dubey J. P., Miller N. L., Frenkel J. K. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1970; 157:1767-1770.
- Dubey J. C., Speer C. A., Shen S. K., Kwok O. C. H., Blixt J. A., Oocysts-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *The Journal of Parasitology* 1997; 83:870-882.
- Duveau E., Chomienne F., Seguin G., Convulsion liée à un surdosage en pyriméthamine. *Archives de Pédiatrie* 1996; 3:286-287.
- Dubremetz J. F., Achabarou A., Bermudes D., Joiner K. A. Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii*/host-cell interaction. *Parasitology Research* 1993; 79: 402–408.
- Dzierszynski F., Nishi M., Ouko L., Ross D. S. Dynamics of *Toxoplasma gondii* differentiation. *Eukaryotic Cell* 2004; 3: 992-1003.
- El Hajj H., Lebrun M., Arold S. T., Vial H., Labesse G., Dubremetz J. F. .ROP18 is a roptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS pathogens* 2007; 3:e14.
- Elmalem J., Poulet B., Garnier R., Frelon J. H., Castot A. Severe complications arising from the prescription of pyrimethamine for infants being treated for toxoplasmosis. *Thérapie* 1985; 40:357:359.
- Eyles D. E., Coleman N., Evaluation of the curative effects of pirimetamine and sulfadiazine, alone and in combination. On experimental mouse toxoplasmosis. *Antibiotics and Chemotherapy* 1955; 5:529-539.
- Fang F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Review Microbiology* 2004; 2: 820-832.
- Fentress S. J., Behnke MS, Dunay IR, Mashayekhi M, Rommereim LM, Fox BA, Bzik DJ, Taylor GA, Turk BE, Lichti CF, Townsend RR, Qiu W, Hui R, Beatty WL, Sibley LD. Phosphorylation of Immunity –Related GTPase by a *Toxoplasma gondii*-Secreted Kinase promotes Macrophage Survival and Virulence. *Cell Host Microbe* 2010; 8:484-495.
- Ferguson D. J., Birch-Andersen A., Siim J. C., Hutchison W. M. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii* III. Formation of sporozoites within the sporocysts. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica - Section B* 1979; 87:253-260.
- Ferguson D. J., Dunachie W. M., Siim J. F., Siim J. C. Ultrastructural study of early stages of asexual multiplication and microgametogony of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section B* 1974 ; 82:167–181.
- Ferguson D. J., Hutchison W. M. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitology Research* 1987; 73:483–491.
- Ferguson D. J., Hutchison W. M., Siim J. C. The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica - Section B* 1975; 83; 491-505.
- Ferguson D. J., Hutchison W. M. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. *Virchows Archiv* 1987; A411:39-43.
- Ferguson D. J. *Toxoplasma gondii* and sex : essential or optional extra ? *Trends in Parasitology* 2002 ; 18 :355-359.
- Ferguson D. J. *Toxoplasma gondii* : 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009 ; 104 :133-148.
- Ferguson D. J. P., Dunachie J. F., Siim J. C. Ultrastructural study of early stages of asexual multiplication and microgametogony of *Toxoplasma gondii* in the small

- intestine of the cat. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section B* 1974; 82:167–181
- Ferone R., Burchall J. J., Hitching G. H., *Plasmodium berguei* dihydrofolate reductase. Isolation, properties and inhibition by antifolates. *Molecular Pharmacology* 1969; 5:49-59.
- Ferreira R. A., Oliveira A. B., Ribeiro M. F.B., Tafuri W. L., Vitor R. W.A. *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* 2006; 113:125–129.
- Frenkel J. K., Dubey J. P., Miller N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 1970; 167: 893-896.
- Frenkel J. K., Dubey J. P. Effects of freezing on the viability of toxoplasma oocysts. *The Journal of Parasitology* 1973; 59:587-588.
- Frenkel J. K. *Toxoplasma* in and around us. *Bioscience Journal* 1973; 23: 343-352.
- Freyre A. Separation of *Toxoplasma* cysts from brain tissue and liberation of viable bradyzoites. *The Journal of Parasitology* 1995; 81:1008–1010.
- Gafner S., Wolfender J.-L., Nianga M., Stoeckli-Evans H., Hostettmann J., Antifungal and Antibacterial naftquinones from *Newbouldia laevis* roots. *Phytochemistry* 1996; 42: 1315-1320.
- Gazinelli R., Xu Y., Hieny S., Cheever A., Sher A. Simultaneous depletion of CD4+ e CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology* 1992; 149:175-180.
- Gazinelli R. T., Hieny S., Wynn T. A., Wolf S., Sher A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1993; 90: 6115- 6119.
- Gazzinelli R. T., Wysocka M., Hayashi S., Denkers E.Y., Hieny S., Caspar P., Trinchieri G., Sher A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology* 1994; 153:2533-2543.
- Genuini M., Freiher C., Girard I., de Montgolfier I., Kieffer F., Mitanchez D. Intoxication neonatal à la pyriméthamine: un risqué lié à l'absence de forme galénique pédiatrique? *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 2011. 18:1084-1086.
- Goulart M. O. F., Zani C. L., Tonholo J., Freitas L. R., Abreu F. C., Olivera A. B., Raslan D. S., Starling S., Chiari E. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, beta-lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2004; 14:1145-9.
- Gracy R. W., Talent J. M., Kong Y., Conrad C. C. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? *Mutation Research* 1999; 428:17-22.
- Grigg M. G., Bonnefoy S., Hehl A. B., Suzuki Y., Boothroyd J. C. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* 2001; 294:161-165.
- Gross U., Bohne W. *Toxoplasma gondii*: strain- and host cell- dependent induction of stage differentiation. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 1994; 41:10S-11S.
- Hänkanson S., Charron A. J., Sibley L. D., *Toxoplasma* vacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *European Molecular Biology Organization* 2001; 20:3132-3144.
- Holland, G.N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. *American Journal of Ophthalmology* 2003; 136: 973–988.

- Holliman RE. Clinical sequelae of chronic maternal Toxoplasmosis. *Review in Medical Microbiology* 1994; 5: 47-55.
- Howe D. K., Sibley L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of Infectious Disease* 1995; 172:1561-1566.
- Hunn J. P., Feng C. G., Sher A., Howard J. C. The immunity-related GTPase in mammals: a fast-evolving cell-autonomous resistance system against intracellular pathogens. *Mammalian Genome* 2010; 22:43-54.
- Hunter C. A., Remington J. S. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *Journal of Infectious Disease* 1994; 170:1057-1067.
- Hutchison W. M., Dunachie J. F., Siim J. C., Work K. The life cycle of *Toxoplasma gondii*. *British Medical Journal* 1969; 4: 806.
- Hutchison W. M., Dunachie J. F., Work K., Siim J. C. The life cycle of the coccidian parasite *Toxoplasma gondii* in the domestic cat. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1971; 65: 380-399.
- Iacheri B., Fiore T., Papadaki T., Androudi S., Janjua S., Bhaila I., Foster C. S. Adverse drug reactions to treatment for ocular toxoplasmosis: A retrospective chart review. *Clinical Therapeutics* 2008; 30: 2069-2074.
- Ibrahim H. M., Bannai H., Xuan X., Nishikawa Y. *Toxoplasma gondii* cyclophilin 18-mediated production of nitric oxide induces bradyzoite conversion in CCR5-dependent manner. *Infection and Immunity* 2009; 77:3686-3695.
- Ilan Y. A., Czapski G., Meisel D. The one-electron transfer redox potentials of free radicals. I. The oxygen/peroxide system. *Biochimica and Biophysica Acta* 1976; 430:209-224.
- Inoue M., Sato E. F., Nishikawa M., Park A. M., Kira Y., Imada I., Utsumi K. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry* 2003; 10:2495-2505.
- Israelski D. M., Araujo F. G., Conley F. K., Suzuki Y., Sharma S., Remington J. S. Treatment with anti-L3T4 (CD4) monoclonal antibody reduces the inflammatory response in toxoplasmic encephalitis. *The Journal of Immunology* 1989; 142:954-958.
- Jacobs L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology* 1960; 46:11-21.
- Jensen K. D., Wang Y., Wojno E. D., Shastri A. J., Hu K., Cornel L., Boedec E., Ong Y. C., Chien Y. H., Hunter C. A., Boothroyd J. C., Saeij J. P. *Toxoplasma* polymorphic effectors determine macrophage polarization and intestinal inflammation. *Cell Host & Microbe* 2011; 9:472-483.
- Jerome M. E., Radke J. R., Bohne W., Roos D. S., White M. W. *Toxoplasma gondii* bradyzoites form spontaneously during sporozoite-initiated development. *Infection and Immunity* 1998; 66:4838-4844.
- Jones, J.L., Hanson, D.L., Chu, S.Y., Ciesielski, C.A., Kaplan, J.E., Ward, J.W., Navin, T.R. Toxoplasmic encephalitis in HIV infected persons: risk factors and trends. The Adult/Adolescent Spectrum of Disease Group. *AIDS* 1996; 10: 1393-1399.
- Jones L. A., Alexander J., Roberts C. W. Ocular toxoplasmosis: in the storm of the eye. *Parasite Immunology* 2006; 28: 635-42.
- Jones T. C., Bienz K. A., Erb P. In vitro cultivation of *Toxoplasma gondii* cysts in astrocytes in the presence of gamma interferon. *Infection and immunity* 1986; 51:147-156.
- Kamat V. S., Chuo F. Y., Kubo I., Nakanishi K., Anti-microbial agents from an East-African medicinal plant, *Erythrina abyssinica*. *Heterocycles* 1987; 15: 1163-1170.

- Kayser O.; Kiderlen A. F.; Laatsch H., Croft S. L., *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. *Acta Tropica* 2000; 77, 307-314.
- Kean B. H., Kimball A. C., Christenson W. N. An epidemic of acute toxoplasmosis. *The Journal of American Medical Association* 1969; 208: 1002–1004.
- Khan I. A., Murphy P. M., Casciotti L., Schwartzman J. D., Collins J., Gao J. L., Yeaman G. R. Mice lacking the chemokine receptor CCR1 show increased susceptibility during *Toxoplasma gondii* infection. *The Journal of Immunology* 2001; 166: 1930-1937.
- King C. A. Cell motility of sporozoan protozoa. *Parasitology Today Journal* 1988; 11: 315-318.
- Koh J-Y, Choi D. W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *Journal of Neuroscience Method* 1987; 20:83–90.
- Köhler S., Delwiche C. F., Denny P. W., Tilney L. G., Webster P., Wilson R. J. M., Palmer J. D., Roos D. S. A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science* 1997; 275:1485-1489.
- Kongsaengdao S., Samintaraphaya K., Oranratnachai K., Prapakarn W., Apichartpiyakul C. Randomized controlled trial of pyrimethamine plus sulfadiazine versus trimetoprim plus sulfamethoxazole for treatment of toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. *Journal of International Association of Physicians in AIDS care* 2008; 7, 11-16.
- Kumagai Y., Tsurutani Y., Shinyashiki M., Taked S. H., Nakai Y., Yoskikawa T., Shimojo N., Bioactivation of lapachol responsible for DNA scission by NADPH-cytochrome P450 reductase. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 1997; 3: 245-250.
- Kwok I. Y., Schüluter D., Clayton C., Soldati D. The antioxidant systems in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. *Molecular Microbiology* 2004; 51:47-61.
- Lambeth J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4: 181-189.
- Lecordier L., Mercier C., Torpier G., Tourvieille B., Darcy F., Liu J. L., Maes P., Tartar A., Capron A., Cesbron-Delauw M. F. Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1993; 59: 143–154.
- Leonard S. S., Harris G. K., Shi X. Metal- induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 37: 1921-1942.
- Leport C., Raffi F., Matheron S., Katlama C., Regnier B., Saimot A. G., Marche C., Vilde J. L., Treatment of central nervous system toxoplasmosis with pyrimethamine/sulfadiazine combination in 35 patients with the acquired immunodeficiency syndrome: efficacy of a long-term continuous therapy. *The American Journal of Medicine* 1988; 84(1): 94-100.
- Leport C., Chêne G., Morlat P., Luft B. J., Rousseau F., Pueyo S., Hafner R., Miro J., Aubertin J., Salamon R., Vilde J. L., 1996. Pyrimethamine for primary prophylaxis of toxoplasmic encephalitis in patients with human immunodeficiency virus infection: a double-blind, randomized trial. Agence Nationale Recherche sur le Sida 005-AIDS Clinical Trial Group 154 Group Members. *The Journal of Infectious Disease* 1996; 173:91-97.
- Lerliche M. A., Dubremetz J. F. Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granule of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1991; 45: 249-260.

- Li J., Zhang J. Inhibition of apoptosis by ginsenoside Rg1 in cultured cortical neurons. *Chinese Medical Journal* 1997; 110:535–9.
- Lin M., Tsao L., Huang L., Kuo S., Weng J., Ko H., Lin C., Lee M., Wang J. Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated NO production by crotafuran B in RAW 264.7 macrophages involves the blockade of NF- κ B activation through the increase in I κ B α synthesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 210:108
- Linardi M. C. F., De Oliveira M. M., Sampaio R. P. A lapachol derivative active against mouse lymphocytic leukemia P-388. *Journal of Medicinal Chemistry* 1975; 18, 1159-1161.
- Ling Y. M., Shaw M. H., Ayala C., Coppens I., Taylor G. A., Ferguson D. J., Yap G. S. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* 2006;203:2063-2071.
- Liochev S. I., Fridovich I. The role of iron–sulfur clusters in *in vivo* hydroxyl radical production. *Free Radical Biology and Medicine* 1994; 16: 29–33.
- Luder C. G., Algnier M., Lang C., Bleicher N., Gross U. Reduced expression of inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in active murine macrophages. *The International Journal of Parasitology* 2003; 33:833-844.
- Luder C. G., Giraldo-Velasquez M., Sendtner M., Gross U. *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. *The Journal of Experimental Parasitology* 1999; 93:23-32
- Luft B. J., Brooks R. G., Conley F. K., McCabe R. E., Remington J. S. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *The Journal of American Medical Association* 1984; 252: 913–917.
- Luft B. J., Conley F., Remington J. S., Laverdiere M., Wagner K. F., Levine J. F., Craven P. C., Strandberg D. A., File T. M., Rice N., Meunier-Carpentier F., Outbreak of central-nervous-system toxoplasmosis in western Europe and North America. *The Lancet* 1983; 1:781–784.
- Luft B. J., Remington J. S., Toxoplasmic encephalitis in AIDS, *Clinical Infectious Disease* 1992; 15: 211-222.
- McAuley J., Boyer K. M., Patel D., Mets M., Swisher C., Roizen N., Wolters C., Stein L., Stein M., Schey W., Remington J., Meier P., Johnson D., Heydeman P., Holfels E., Withers S., Mack D., Brown C., Patton D., McLeod R. Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital toxoplasmosis: the Chicago Collaborative Treatment Trial. *Clinical Infectious Diseases* 1994; 18: 38–72.
- McCabe R. E., Brooks R. G., Dorfman R. F., Remington J. S. Clinical spectrum in 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *Reviews of Infectious Disease* 1987; 9:754–774.
- McCord J. M., Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *The Journal of Biological Chemistry* 1969; 244: 6049–6055.
- Meneceur P., Bouldouyre M., Aubert D., Villena I., Menotti J., Sauvage V., Garin J., Derouin F., In Vitro Susceptibility of Various Genotypic Strains of *Toxoplasma gondii* to Pyrimethamine, Sulfadiazine, and Atovaquone. *Antimicrobiol Agents and Chemotherapy* 2008; 52:1269-1277.
- Molina M. P. P., Vilamil S. H. F., Perissinotti L. J., Stoppani A. O. M. Redox cycling of o-naphthoquinones in Trypanosomatids: Superoxide and hydrogen peroxide production. *Biochemical Pharmacology* 1996; 52: 1875-1882.

- Montoya J. G., Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *The Lancet* 2004; 363:1965-1976.
- Mordue D. G., Desai N., Dustin M., Sibley L. D. Invasion of *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell membrane proteins on basis of their membrane anchoring. *The journal of experimental Medicine* 1999; 190:1783-1792.
- Mordue D. G., Sibley L. D. A novel population of Gr-1+-activated macrophage induced during acute toxoplasmosis. *Journal of Leukocyte Biology* 2003; 74:1015-1025.
- Morisaki J. H., Heuser J. E., Sibley L. D. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. *Journal of Cell Science* 1995;108: 2457–2464.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983;65:55–63.
- Murray H. W., Rubin B. Y., Carriero S. M., Harris A. M., Jaffee E. A., Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology* 1985; 134:1982–1988.
- Netto, C. D., Santos, E. S. J., Castro, C. P., da Silva, A. J. M., Rumjanek, V. M., Costa, P. R. R. (+/-)-3,4-Dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan and derivatives: Cytotoxic effect on human leukemia cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009; 44: 920-925.
- Netto C. D., Da Silva A. J. M., Salustiano E. J. S., Bacelar T. S., Riça I. G., Cavalcante M. C. M., Rumjanek V. M., Costa P. R. R., New pterocarpanquinones: Synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- α modulation in human PBMC cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2010; 18:1610-1616.
- O'Brien P.J. Molecular Mechanisms of Quinone Cytotoxic. *Chemical-biological Interactions* 1991; 80: 1-41.
- Odberg-Ferragut C., Renault J.P., Viscogliosi E., Toursel C., Briche I., Engels A., Lepage G., Morgenstern-Badarau I., Camus D., Tomavo S., Dive D. Molecular cloning expression analyses and iron metal cofactor characterization of a superoxide dismutase from *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2000; 106:121-129.
- Oliveira A. B., Zani, C. L., Raslan D. S., Miraglia M. C., Mesquita A. A. L., Zani C. L., Ferreira D. T., Maia J. G. S., Estrutura Química e Atividade Biológica de Naftoquinonas de Bignoniáceas Brasileiras *Química Nova* 1990; 13:302-307.
- Ong Y-C., Reese M. L., Boothroyd J. C. *Toxoplasma* rhoptry protein 16 (ROP16) subverts host function by direct tyrosine phosphorylation of STAT6. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; 285: 28731-28740.
- Ossorio P. N., Dubremetz J. F., Joiner K. A. A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 21: 15350–15357.
- Orrenius S. Oxidative stress studied in intact mammalian cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London- Series B* 1985; 311:673-677.
- Overdulve J. P. The identity of *Toxoplasma* Nicolle & Manceaux, 1909 with *Isospora* Schneider, 1881 (I). *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen* 1970; 73 (Series C): 129-151.
- Pawlowski N., Khaminets A., Hunn J. P., Papic N., Schmidt A., Uthaiyah R. C., Lange R., Vopper G., Martens S., Wolf E., Howard J. C. The activation mechanism of

- Irga6, an interferon-inducible GTPase contributing to mouse resistance against *Toxoplasma gondii*. *BioMed Central Biology* 2011; 9:7.
- Pena H. F. J., Gennari S. M., Dubey J. P., Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology* 2008; 38:561-569.
- Pfefferkorn ER. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 1984; 81:908-912.
- Piekarski G., Pelster B., Witte H. M. Endopolygeny in *Toxoplasma gondii*. *Zeitschrift fur Parasitenkunde* 1971; 36:122-130.
- Pink J.J., Planchon S.M., Tagliarino C., Varnes M.E., Siegel D., Boothman D.A. NAD(P)H:Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of beta-lapachone cytotoxicity. *Journal Biological Chemistry* 2000; 275: 5416-5424.
- Pink J. J., Planchon S. M., Tagliarino C., Varnes M. E., Siegel D., Boothman D. A. NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase Activity Is the Principal Determinant of b-Lapachone Cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 275: 5416-5424.
- Pinto C. N., Dantas A. P., De Moura K. C. G., Emery F. S., Polequevitch P. F., Pinto M. C. F. R., De Castro S. L., Pinto A. V. Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy. *Arzneimittel-Forschung* 2000; 12, 1120-1128.
- Porchet-Hennere E., Vivier E., Torpier G. Origine des membranes de la paroi chez *Toxoplasma*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 1985; 60:101-110.
- Porter S.B., Sande M.A. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England Journal of Medicine* 1992; 327: 1643-1648.
- Portes J. de A., Netto C. D., da Silva A. J., Costa P. R., DaMatta R. A., dos Santos T. A. De Souza W. Seabra S. H. A new pterocarpanoquinone that affects *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*. *Veterinary parasitology* 2012; 186:261-269.
- Radke J. R., White M. W. A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1998; 94:237-47.
- Remington J. S. Toxoplasmosis in the adult. *Journal of Urban Health : Bulletin of the New York Academy of Medicine* 1974; 50:211-227.
- Remington, J.S., McLeod, R., Thulliez, P., Desmonts, G., 2006. Toxoplasmosis. In: Remington, J.S., Klein, J.O., Wilson, C.B., Baker, C.J. (Eds.), *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. Elsevier Saunders: Philadelphia, pp. 947-1091.
- Reese M. L., Boothroyd J. C. A conserved noncanonical motif in the pseudoactin site of the ROP5 pseudokinase domain mediates its effect on *Toxoplasma* virulence. *The Journal of Biological Chemistry* 2011; 293:66-39375.
- Robben P. M., Mordue D. G., Truscott S. M., Takeda K., Akira S., Sibley L. D. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. 2004; 172: 3686-3694.
- Rosowski E. E., Lu D., Julien L., Rodda L., Gaiser R. A., Jensen K. D., Saeij J. P. Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. *The Journal of Experimental Medicine* 2011; 208:195-212.
- Sabin A. B., Olitsky P. K. *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. *Science* 1937; 85: 336-338.

- Saeij J. P., Boyle J. P., Grigg M. E., Arrizabalaga G., Boothroyd J. C. Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. *Infection and Immunity* 2005; 73:695-702.
- Saeij J. P., Boyle J. P., Collier S., Taylor S., Sibley L. D., Brooke-Powell E. T., Ajioka J. W., Boothroyd J. C. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* 2006; 314: 1780-1783.
- Saeij J. P. J., Collier S., Boyle J. P., Jerome M. E., White M. W., Boothroyd J. C. Toxoplasma co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. *Nature* 2007; 445: 324-327.
- Santos A. F., Ferraz P. A., Pinto A. V., Pinto M. C. F. R., Goulart M. O. F., Sant' Ana, A. E. G., Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. *International Journal for Parasitology* 2000; 30: 1199- 1202.
- Scharton-Kersten T. M., Yap G, Magram J, Sher A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *The journal of Experimental Medicine* 1997;185:1261-273.
- Schwab J. C., Beckers C. J. M., Joiner, K. A. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* 1994; 91: 509-513.
- Sheffield, H. G. Schizogony in *Toxoplasma gondii*. An electron microscopic study. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 1970; 37:237-242.
- Sheffield H. G., Melton M. L. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology Research* 1968; 54: 209-226.
- Shrestha S. P., Tomita T., Weiss L. M., Orlofsky A. Proliferation of *Toxoplasma gondii* in inflammatory macrophages in vivo is associated with diminished oxygen radical production in the host cell *International Journal for Parasitology* 2006; 36: 433-441.
- Sibley L. D. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. *Traffic* 2003; 4: 581-586.
- Sibley L. D., Ajioka J. W. Population Structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annual Review of Microbiology* 2008; 62:329-351.
- Sibley L. D., Boothroyd J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 1992; 359:82-85.
- Sibley L. D., Niesman I. R., Parmley S. F., Cesbron-Delauw M. F. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cells vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science* 1995; 108:1669-1677.
- Sibley L. D., Weidner E., Krahenbuhl J. L. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 1985; 315: 416-419.
- Sinai A. P., Joiner K. A. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *The Journal of Cell Biology* 2001; 154:95-108.
- Sinai A. P., Webster P., Joiner K. A. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *Journal of Cell Science* 1997; 110: 2117-2128.
- Skariah S., McIntyre M. K., Mordue D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitology Research* 2010; 107:253-260.
- Soete M., Camus D., Dubremetz J. F. Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* in vitro. *Experimental Parasitology* 1994; 78:361-70.

- Soete M., Dubremetz J. F. *Toxoplasma gondii*: kinetics of stage-specific protein expression during tachyzoite-bradyzoite conversion in vitro. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 1996; 219:76–80.
- Soldati D., Dubremetz J. F., Lebrun M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 2001; 31: 1293–1302.
- Son E. S., Song K. J., Shin J. C., Nam H. W. Molecular cloning and characterization of piroxiredoxin from *Toxoplasma gondii*. *The Korean Journal of Parasitology* 2001; 39: 133-141.
- Speer C. A., Dubey J. P. Ultrastructure of the early stages of infection in mice fed oocysts of *Toxoplasma gondii*. *Cambridge Journal of Parasitology* 1998 ; 116:35–42.
- Steinfeldt T., Könen-Waisman S., Tong L., Pawlowski N., Lamkemeyer T., Sibley L. D., Hunn J. P., Howard J. C. Phosphorylation of mouse immunity-related GTPase (IRG) resistance proteins is an evasion strategy for virulent *Toxoplasma gondii*. *PLoS Biology* 2010; 8: e1000576.
- Su C., Evans D., Cole R. H., Kissinger J. C., Ajioka J. W., Sibley L. D. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science* 2003; 299:414-416.
- Subramanian S., Ferreira M. M. C., Trsci M. A structure-activity relationship study of lapachol and some derivatives of 1,4-naphthoquinones against carcinosarcoma walker 256. *Structural Chemistry* 1998; 9:47-57.
- Suss-Toby E, Zimmerberg J, Ward G. E. *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fusion pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 1996; 93:8413–8418.
- Suzuki Y., Conley F. K., Remington J. S., Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *The Journal of immunology* 1989; 143:2045-2050.
- Sweetman S., Blake P., Mcglashn J., Martindale: The complete drug reference. 35^a edição, *Pharmacological Press*: London, 2007.
- Teixeira M. J., De almeida Y. M., Viana J. R., Holanda Filha J. G., Rodrigues T. P., Prata J. R. C. Jr., Coelho I. C. B.; Raio V. S., Pompeu M. M. L. In vitro and in vivo Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). *Phytotherapy Research* 2001; 15: 44-48.
- Tenter AM, Heckerth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 2000; 30: 1217-1258.
- Thierry J. P. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *Journal de Microscopie* 1967; 6:987-1018.
- Tsuda S., Kosaka Y., Matsusaka N., Dadaki Y. Detection of pyrimethamine-induced DNA damage in mouse embryo and maternal organs by the modified alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 1998; 415:69-77.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C. J., Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004; 266: 37-56.
- Valko M., Morris H., Cronin M.T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 2005; 12: 1161-1208.
- Van Meerloo J., Kaspers G. J., Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in Molecular Biology* 2011;731:237–45.

- Venditti P., Daniele C. M., De Leo T., Di Meo S., Effect of Phenobarbital treatment on characteristics determining susceptibility to oxidants of homogenates, mitochondria and microsomes from rat liver. *Cellular Physiology and Biochemistry* 1998; 8: 328–338.
- Vivier E., Petitprez A. Données ultrastructurales complémentaires, morphologiques et cytochimiques, sur *Toxoplasma gondii*. *Protistologica* 1972; 8:199-221.
- Vogel N., Kirisits M., Michael E., Bach H., Hostetter M., Boyer K., Simpson R., Holfels E., Hopkins J., Mack D., Mets M.B., Swisher C.N., Patel D., Roizen N., Stein L., Stein M., Withers S., Mui E., Egwuagu C., Remington J., Dorfman R., McLeod R.. Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. *Clinical Infectious Disease* 1996; 23, 1055-1060.
- Weiss L. M., Laplace D., Takvorian P. M., Tanowitz H. B., Cali A., Wittner M. A cell culture system for study of the development of *Toxoplasma gondii* bradyzoites. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 1995; 42:150–157.
- Wilson C.B., Tsai V., Remington J.S. Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages: possible mechanism for survival of intracellular pathogens. *The Journal of Experimental Medicine* 1980 ; 151 : 328–346.
- Wong B., Gold J. W., Brown A. E., Lange M., Fried R., Grieco M., Mildvan D., Giron J., Tapper M. L., Lerner C. W., Armstrong D. Central-nervous-system toxoplasmosis in homosexual men and parenteral drug abusers. *Annals of Internal Medicine* 1984; 100: 36–42.
- Wong S. Y., Remington J. S., Toxoplasmosis in pregnancy. *Clinical Infectious Disease* 1994; 18:853-861.
- Zangar R. C., Davydov D. R., Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2004 ;199: 316– 33
- Zhang Y. W., Halonen S. K., Ma Y. F., Wittner M., Weiss L. M. Initial characterization of CST1, a *Toxoplasma gondii* cyst wall glycoprotein. *Infection and Immunity* 2001; 69:501–507.
- Zhao Y. O., Ferguson D. J., Wilson D. C., Howard J. C., Sibley L. D., Yaps G. S. Virulent *Toxoplasma gondii* evade immunity-related GTPase-mediated parasite vacuole disruption within primed macrophages. *The Journal of Immunology* 2009; 182: 3775-3781.
- Zufferey J, Sugar A, Rudaz P, Bille J, Glauser MP, Chave JP. Prevalence of latent toxoplasmosis and serological diagnosis of active infection in HIV-positive patients. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease* 1993; 12: 591-595.
- Yamamoto M., Standley D. M., Takashima S., Saiga H., Okuyama M., Kayama H., Kubo E., Ito H., Takaura M., Matsuda T., Soldati-Favre D., Takeda K. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *The Journal of Experimental Medicine* 2009; 206:2747-2760.
- Yao H., Edirisinghe I., Yang S. R., Rajendrasozan S., Kode A., Caito S., Adenuga D., Rahman I. Genetic ablation of NADPH oxidase enhances susceptibility to cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice. *American Journal of Pathology* 2008; 172:1222-1237.
- Yarovinsky F., Zhang D., Andersen J. F., Bannenberg G. L., Serhan C. N., Hayden M. S., Hieny S., Sutterwala F. S., Flavel R. A., Ghosh S., Sher A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profiling-like protein. *Science* 2005; 308: 1626-1629.

- Yarovinsky F., Kanzier Hieny S., Coffman R. L., Sher A. Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4+ T cell response. *Immunity* 2006; 25: 655-664.
- Yahiaoui B., Dzierzinski F., Bernigaud A., Slomianny C., Camus D., Tomavo S. Isolation and characterization of a subtractive library enriched for developmentally regulated transcripts expressed during encystation of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1999; 99:223–235.