

## **AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-*Toxoplasma gondii*, IN VIVO, DA ROSUVASTATINA EM FASE CRÔNICA DA DOENÇA.**

Francini Martini Mantelo (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Fernanda Ferreira Evangelista (CAPES/UEM), Lucimara Fátima Beletini (CAPES/UEM), Amanda Hinobu de Souza (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Keller Karla Lima (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Priscilla Laet Santana (Co-orientador), Ana Lúcia Falavigna-Guilherme (Orientador), e-mail: [alfguilherme@uem.br](mailto:alfguilherme@uem.br)

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Ciências Básicas da Saúde-DBS/Maringá, PR.

**Área e subárea do conhecimento conforme tabela do CNPq/CAPES:**  
Ciências Biológicas – Parasitologia.

**Palavras-chave:** toxoplasmose crônica, *Toxoplasma gondii*, rosuvastatina.

### **Resumo:**

Infecção por *Toxoplasma gondii* tem elevada prevalência mundial, podendo se manifestar com considerável gravidade na transmissão congênita e em indivíduos imunocomprometidos, atingindo sistema nervoso central, globo ocular, com variados desfechos clínicos. As drogas disponíveis atualmente são ineficazes na fase crônica/cística, e com elevada toxicidade/efeitos colaterais. É necessário a pesquisa de novos fármacos com atividade contra o *T. gondii*, inclusive, com atividade sobre a forma cística do parasito. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito *in vivo* da rosuvastatina na infecção crônica do *T. gondii*. Camundongos Swiss foram infectados, via oral, com 25 cistos da cepa ME-49. Decorridos 50 dias, foi retirado sangue retro orbitário e analisado pelo método de aglutinação modificado (MAT), para em seguida, o tratamento ser iniciado. Os animais foram divididos em grupos de sete: controles infectados e não infectados; tratados por 21 dias com rosuvastatina 10mg/kg/dia; rosuvastatina 40/mg/kg/dia; pirimetamina (12,5mg/kg) mais sulfadiazina (100mg/Kg). Após, foram retirados órgãos alvos para análise molecular (PCR) e histológica. Todos os animais infectados apresentaram MAT positivo comprovando a infecção. Foram visualizados cistos nos animais tratados e não tratados, não havendo diferença entre eles. DNA do *T. gondii* foi detectado, após 71 dias de infecção, tanto nos tecidos dos animais não tratados como tratados com diferentes esquemas terapêuticos. Os grupos tratados com rosuvastatina tiveram maior sobrevida, embora esta droga não interferiu no curso da infecção crônica. A rosuvastatina não foi capaz de atuar sobre os cistos de *T. gondii*, *in vivo*, apesar de ter sido capaz de eliminar taquizoítas *in vitro*.

### **Introdução**

*Toxoplasma gondii* é provavelmente o protozoário mais difundido entre a população humana e animal, incluindo aves (HIGA et al. 2014). O Brasil apresenta frequências mais elevadas nos Estados do Sul e do Norte. A infecção se dá pela ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas, ingestão acidental de oocistos eliminados em fezes de gatos infectados e dispersos em águas, frutas e verduras (DUBEY; SUNDARARAJ, 2006). Também é possível ocorrer transmissão vertical devido à passagem de taquizoítas, via transplacentária, em gestantes sob infecção aguda (COSTA, 2009). Em relação ao tratamento quimioterápico da toxoplasmose há várias dificuldades, pois as drogas disponíveis são capazes de atuar impedindo a replicação dos taquizoítas na fase aguda ou em reativação da fase crônica da infecção, não sendo suficientemente eficazes na fase crônica ou cística. Ademais, são drogas que apresentam toxicidade e efeitos colaterais importantes (DUBEY; SUNDARARAJ, 2006). O desenvolvimento de novos fármacos é de grande importância para a saúde humana se forem capazes de destruir a forma cística intracelular (EISSA et al. 2015) e eliminar as consequências da toxoplasmose ocular e cerebral. Diversas drogas têm sido testadas experimentalmente, mas poucas têm dados conclusivos sobre estudos clínicos, laboratoriais, já que cepas de *T. gondii* tem apresentado resistência a uma gama de inibidores (EISSA et al. 2015). Estudos tem demonstrado inibição da proliferação de taquizoitos *in vitro* pelas estatinas, dentre elas a rosuvastatina (SANFELICE et al. 2017). Porém, seu efeito *in vivo* ainda não foi comprovado. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito anti-*T. gondii*, *in vivo*, da rosuvastatina em associação com medicamentos preconizados em esquemas terapêuticos na fase crônica da doença.

## Materiais e métodos

Utilizou-se camundongos suíços, fêmeas, entre 21 e 25 dias seguindo as orientações éticas da Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá (Protocolo nº 5654290317). Os animais foram infectados por gavagem, com 25 cistos teciduais da cepa ME49 de *T. gondii*. Após 50 dias os camundongos foram divididos em cinco grupos de sete animais cada, e tratados por 21 dias, de acordo com os seguintes esquemas (Costa e colaboradores, 2009):

Grupo I – não infectado, não tratado; Grupo II – infectado e não tratado; Grupo III: Nos dois primeiros dias de tratamento foi administrada uma dose de ataque de sulfadiazina de 100mg/kg de 12/12 horas, a partir do terceiro dia foi administrados 50mg/kg de 12/12 horas. A dose de pirimetamina administrada nos dois primeiros dias foi de 12,5mg/kg de 12/12 horas e nos demais dias 12,5 mg/kg uma vez ao dia; Grupo IV – Infectado e tratado com rosuvastatina 10 mg/Kg/dia; Grupo V – infectado e tratado com rosuvastatina 40 mg/Kg/dia.

Após 21 dias de tratamento, os animais foram autopsiados e retirados cérebro, músculo, fígado e pulmão para análise. Os órgãos foram pesados e divididos em duas partes, sendo uma delas macerada com auxílio de tubo e

bastão de vidro, e suspenso em 1,0mL de solução salina a 0,9% e submetidos a PCR com *primer* B1 para identificação do DNA do parasito. Os demais foram fixados em solução de formalina 5% e emblocados em parafina para a realização de cortes histológicos. A avaliação histológica foi realizada em dez campos óticos intercalados, para contagem do número de cistos e a média de bradizoítas, presença de focos inflamatórios e alterações teciduais.

Coletou-se sangue retro-orbital no pré-tratamento que foi destinado à realização do MAT, para confirmar a presença de IgG anti - *T. gondii*.

## Resultados e Discussão

O teste MAT, como esperado, foi positivo para todos os animais infectados. A utilização deste teste foi importante para comprovar a infecção pelo *T. gondii* antes de submeter os animais aos tratamentos. Após o tratamento sobreviveram 29/35 animais. A mortalidade de animais foi maior no grupo III (sobrevida de 4 animais), provavelmente devido a elevada toxicidade das drogas sulfadiazina e pirimetamina. Nos demais grupos a sobrevivida foi de 6 animais para GI, GII e GV, e 7 animais para o grupo G IV, uma vez que a cepa ME-49 é considerada de virulência intermediária, de característica cistogênica e cronificação da doença. Foi possível detectar a presença de DNA do parasito tanto no cérebro como pulmão, músculo e fígado dos animais dos grupos II a V, não havendo diferença entre o grupo II (controle não tratado) e os grupos de tratamento com Sulfadiazina+Pirimetamina, rosuvastatina 10 e 40mg. Não foi observada presença de alterações histológicas nos tecidos, tais como focos inflamatórios e alterações celulares, destacando que o experimento foi desenvolvido em estágio crônico, finalizando aos 71 dias da infecção. Considerando ser estágio crônico e com o mesmo padrão de achados entre os grupos, como a presença de cistos cerebrais tanto no GII (controle não tratado) como nos grupos submetidos a tratamento, podemos observar que, embora fosse demonstrada a atividade da rosuvastatina *in vitro* contra taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) (SANFELICE et al. 2017), o mesmo não foi observado no experimento *in vivo*, durante a infecção crônica.

## Conclusões

A presença do DNA do *T. gondii* foi detectável mesmo após 71 dias de infecção, tanto nos tecidos de camundongos não tratados e tratados com os diferentes esquemas de drogas utilizados. O mesmo ocorreu com a presença de cistos teciduais, os quais foram observados em todos os grupos infectados, porém sem reação inflamatória local. Os animais dos grupos tratados com rosuvastatina tiveram maior sobrevivida, embora esta droga não interferiu no curso da infecção crônica.

## Agradecimentos

À Fundação Araucária pelo financiamento e à equipe do Laboratório de Parasitologia da UEM.

## Referências

COSTA, I. N. **Avaliação Da Eficácia Dos Tratamentos Com a Associação de Sulfadiazina, Pirimetamina e Ácido Folínico (SPAF), Azitromicina, Infusão de Artemisia Annu L. e Espiramicina Na Prevenção Da Transmissão Vertical Da Toxoplasmose Em Calomys Callosus.** 2009. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

DUBEY, A. K.; SUNDARARAJ, R. *Distinctaleyrodes setosus* Dubey & Sundararaj (Sternorrhyncha: Aleyrodidae), a new whitefly genus and species from India. **Zootaxa**. v. 1154, n. 1, p. 35-39, 2016.

EISSA, M. M. et al. Could miltefosine be used as a therapy for toxoplasmosis?. **Experimental Parasitology**. v. 157, p. 12-22, 2015

HIGA, L. T. et al. *Toxoplasma Gondii* Genotypes Isolated from Pregnant Women with Follow-up of Infected Children in Southern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 108, n. 4, p. 244–46, 2014.

SANFELICE, R. A. et al. Activity of rosuvastatin in tachyzoites of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in HeLa cells. **Experimental Parasitology**. v. 181, p. 75-81, 2017.