

**Síntese de trioxolanos e tetraoxanos com potencial
atividade contra *Toxoplasma gondii***

Inês Costa

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Maria de Lurdes
dos Santos Cristiano

2019

**Síntese de trioxolanos e tetraoxanos com potencial
atividade contra *Toxoplasma gondii***

Inês Costa

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Maria de Lurdes
dos Santos Cristiano

2019

Síntese de trioxolanos e tetraoxanos com potencial atividade contra *Toxoplasma gondii*

Declaração de autoria de trabalho:

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Universidade do Algarve, 23 de setembro de 2019

Inês Costa

© Copyright: Inês Costa

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, o meu maior agradecimento à Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano por todo o apoio manifestado ao ter aceitado orientar me nesta dissertação. Quero ainda agradecer todo o detalhe minucioso que introduziu neste trabalho, bem como toda a ajuda que me disponibilizou prontamente.

Um genuíno obrigada à Lília, que me orientou no trabalho laboratorial, quero agradecer todo o trabalho, paciência e acima de tudo, todo o conhecimento experimental que me transmitiu. Foram sem dúvida meses muito profícuos e de intenso trabalho que só foram possíveis devido ao acompanhamento da Lília.

À Universidade do Algarve e a todos os docentes que a incorporam agradeço a excelente formação que me ofereceram ao longo destes cinco anos bem como todo o crescimento não só profissional, mas também pessoal que me proporcionaram.

Às equipas de farmacêuticos do Hospital CUF do Porto e da Farmácia Sousa, agradeço por me terem facultado a oportunidade de estágio e por todo o extenso acompanhamento que me ofereceram durante este período de aprendizagem.

Agradeço a toda a minha família, em especial à minha mãe, avós e irmãos que me apoiaram durante toda a minha vida e que estiveram ao meu lado durante todos os obstáculos, sem eles a realização desse curso não seria possível.

Aos meus amigos, obrigada por todos os momentos, pela vossa ajuda e sobretudo por todo o companheirismo que tiveram para comigo. Ao Pedro, tenho muito a agradecer-te essencialmente pela tua paciência.

A todos aqueles que se cruzaram no meu percurso e que contribuíram para que esta etapa chegasse ao fim, muito obrigada.

E por último, mas não menos importante, quero agradecer todo o apoio à Fundação para a Ciência e a Tecnologia - FCT e ao CCMar através dos projetos, UID/MULTI/04326/2019 – CCMAR e PTDC/MAR-BIO/4132/2014.

Resumo

A toxoplasmose é uma doença infecciosa provocada por parasitas da espécie *Toxoplasma gondii*, transmitidos ao ser humano essencialmente através do consumo de carne deficientemente cozinhada que contenha cistos teciduais do parasita. De acordo com a OMS, a toxoplasmose atinge mais de 2 milhões de pessoas na Europa, sendo atualmente considerada uma infecção parasitária negligenciada.

A quimioterapia da toxoplasmose assenta na administração de fármacos clássicos, como a sulfadiazina, a pirimetamina e o ácido folínico, frequentemente administrados em terapêuticas de combinação. No entanto, este arsenal terapêutico evidencia fragilidades, incluindo toxicidade e eficácia reduzida, devido ao desenvolvimento de resistências pelo parasita. Estas fragilidades são agravadas pela necessidade de tratamentos prolongados, podendo conduzir a recrudescência da infecção.

O *Toxoplasma gondii* pertence à filo Apicomplexa, uma família que engloba outros parasitas infecciosos, por exemplo *Plasmodium spp.* O produto natural artemisinina e os seus derivados semissintéticos são usados como fármacos de primeira linha no tratamento da malária, tendo sido equacionada a utilização destes no combate à toxoplasmose. Alguns endoperóxidos sintéticos, nomeadamente trioxolanos e tetraoxanos possuem atividade contra *Plasmodium spp.*, *Leishmania spp.* e também contra *Perkinsus olseni*.

A atual dissertação tem como propósito apresentar uma revisão bibliográfica relativa às estratégias de prevenção e terapia da toxoplasmose, elencando as limitações dos fármacos existentes e enfatizando as perspetivas futuras no desenvolvimento de novas terapêuticas. Será dada especial ênfase à utilização de endoperóxidos para o tratamento de infecções parasitárias, discutindo a sua potencial aplicação no combate à toxoplasmose. Neste contexto, foi também desenvolvida pela autora um trabalho laboratorial que consistiu na síntese de trioxolanos e tetraoxanos potencialmente ativos contra *Toxoplasma gondii*. O trabalho foi desenvolvido no grupo de Reatividade Orgânica e Química Medicinal (OrgMedChem) do CCMAR e contou com o apoio do projeto PTDC/MAR-BIO/4132/2014. Espera-se, no futuro, recolher informação acerca das características estruturais dos endoperóxidos que favorecem a eficácia farmacológica.

Palavras-chave: Toxoplasmose, infecções parasitárias, *Toxoplasma gondii*, quimioterapia da toxoplasmose, resistências, índice de segurança, síntese de trioxolanos e tetraoxanos

Abstract

Toxoplasmosis is an infectious disease caused by parasites of the genus *Toxoplasma gondii*, transmitted to humans essentially through the consumption of poorly cooked meat containing parasite tissue cysts. According to WHO, toxoplasmosis affects more than 2 million people in Europe and is currently considered a neglected parasitic disease.

Toxoplasmosis chemotherapy is based on the use of drugs, such as sulfadiazine, pyrimethamine and folinic acid, which are often administered in combination therapies. However, this therapeutic arsenal shows weaknesses, including toxicity and reduced efficacy, due to the development of resistances. These weaknesses are aggravated by the need for prolonged treatments, which may lead to a resurgence of the infection.

Toxoplasma gondii is a protozoan belonging to the phylum Apicomplexa, a family that includes other infectious parasites, for example *Plasmodium spp.* The natural product artemisin and its semi synthetic derivatives are used as first line drugs in the treatment of malaria, and their use in the fight against toxoplasmosis has been equated. Some synthetic endoperoxides, namely trioxolanos and tetraoxanos, are known to have activity against *Plasmodium spp.*, *Leishmania spp.* and also against *Perkinsus olseni*.

The present dissertation aims to present a literature review on toxoplasmosis prevention and therapy strategies, highlighting the limitations of existing drugs and emphasizing future perspectives in the development of new therapies. Special emphasis will be given to the use of endoperoxides for the treatment of parasitic infections, discussing their potential application in the fight against toxoplasmosis. In this context, a laboratory project was also developed by the author, which consisted in the synthesis of trioxolanos and tetraoxanos potentially active against *Toxoplasma gondii*. The experimental work was developed in the OrgMedChem group of CCMAR, with financial support from project PTDC/MAR-BIO/4132/2014. Further information is expected regarding the structural features of endoperoxides that favor pharmacological efficacy.

Keywords: Toxoplasmosis, infectious diseases, *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis chemotherapy, resistance, safety index, synthesis of trioxolanos and tetraoxanos

Índice de conteúdo

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice de figuras	xi
Abreviaturas.....	xv
1 Introdução	1
1.1 Toxoplasmose	1
1.1.1 História.....	1
1.1.2 Epidemiologia.....	4
1.1.3 Parasita.....	6
1.1.4 Ciclo de vida de <i>T. gondii</i>	7
1.1.5 Transmissão	9
1.1.6 Sintomatologia.....	10
1.1.7 Resposta imunológica do hospedeiro	12
1.1.8 Diagnóstico	14
1.1.9 Prevenção.....	17
2 Quimioterapia utilizada no combate da toxoplasmose	19
2.1 Quimioterapia atual contra <i>T. gondii</i>	19
2.1.1 Pirimetamina.....	20
2.1.2 Sulfadiazina	21
2.1.3 Associação de sulfametoxazol e trimetoprim	22
2.1.4 Clindamicina.....	23
2.1.5 Espiramicina	24
2.1.6 Ácido folínico	25
2.1.7 Atovaquona.....	26

2.2	Avanços na quimioterapia contra <i>T. gondii</i>	27
2.2.1	Ciprofloxacina	29
2.2.2	Triclosan	30
2.2.3	Análogos fosfônicos	31
2.2.4	Apicidina.....	33
2.2.5	Dinitroanilinas	34
2.2.6	Glifosato.....	35
2.2.7	Gossipol	37
2.2.8	DMF e DMFO	38
3	Endoperóxidos	41
3.1	Descoberta da artemisinina	41
3.2	Artemisinina.....	42
3.3	Derivados da artemisinina.....	43
3.4	Sobre o mecanismo de ação da artemisinina	45
3.5	Peróxidos sintéticos como agentes antitoxoplasmáticos	48
3.6	Preparação de trioxolanos e tetraoxanos para avaliação da sua atividade antitoxoplasmática.....	51
i.	Síntese da adamantil-metil-oxima IC2/LC29	53
ii.	Síntese do trioxolano IC3/LC50	54
iii.	Síntese do trioxolano IC4/LC67, por ozonólise.....	55
iv.	Síntese do trioxolano IC5/LC93	56
v.	Síntese do trioxolano IC6/LC68	56
vi.	Síntese do trioxolano IC7/LC189	57
vii.	Síntese do trioxolano IC8/LC145	58
viii.	Síntese do trioxolano IC9	60
ix.	Síntese do trioxolano IC10/LC132	61

x.	Síntese do trioxolano IC11/LC188	62
xi.	Síntese do tetraoxano IC1/LC140.....	62
xii.	Síntese do tetraoxano IC12/LC138.....	63
xiii.	Síntese do tetraoxano IC13/LC153.....	64
xiv.	Síntese do tetraoxano IC14/LC176.....	65
3.7	Parte experimental	65
3.7.1	Síntese da adamantil-metil-oxima IC2/LC29	65
3.7.2	Síntese do trioxolano IC3/LC50	66
3.7.3	Síntese do trioxolano IC4/LC67	66
3.7.4	Síntese do trioxolano IC5/LC93	67
3.7.5	Síntese do trioxolano IC6/LC68	67
3.7.6	Síntese do trioxolano IC7/LC189	68
3.7.7	Síntese do trioxolano IC8/LC145	68
3.7.8	Síntese do trioxolano IC9	68
3.7.9	Síntese do trioxolano IC10/LC132	69
3.7.10	Síntese do trioxolano IC11/LC188	70
3.7.11	Síntese do tetraoxano IC1/LC140.....	70
3.7.12	Síntese do tetraoxano IC12/LC138.....	71
3.7.13	Síntese do tetraoxano IC13/LC153.....	71
3.7.14	Síntese do tetraoxano IC14/LC176.....	72
4	Conclusão.....	73
5	Referências bibliográficas.....	75

Índice de figuras

Figura 1-1: Estado global da seroprevalência de <i>Toxoplasma gondii</i> . O vermelho escuro corresponde a zonas em que a incidência da infecção se encontra acima de 60%, o vermelho claro está associado a zonas com uma prevalência entre 40-60%, o amarelo 20-40%, o azul 10-20% e o verde equivale a zonas com uma prevalência inferior a 10%. O branco exprime a ausência de dados.....	4
Figura 1-2: Representação da morfologia dos parasitas da filo Apicomplexa.....	6
Figura 1-3: Representação do ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> no hospedeiro definitivo e nos hospedeiros intermediários.....	7
Figura 1-4: Representação da resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro contra <i>T. gondii</i>	14
Figura 1-5: Representação dos diferentes ritmos da resposta imunológica dos anticorpos ao <i>T. gondii</i>	15
Figura 2-1: Representação das estruturas da pirimetamina e do ácido dihidrofólico.....	21
Figura 2-2: Representação das estruturas da sulfadiazina, da sulfadoxina e do ácido 4-aminobenzóico.....	22
Figura 2-3: Representação das estruturas do trimetoprim e do sulfametoxazol.....	23
Figura 2-4: Representação das estruturas da clindamicina e da dexametasona.....	24
Figura 2-5: Representação da estrutura da espiramicina.....	25
Figura 2-6: Representação da estrutura do ácido folínico.....	26
Figura 2-7: Representação da estrutura da atovaquona.....	27
Figura 2-8: Representação da estrutura da ciprofloxacina.....	29
Figura 2-9: Representação da estrutura do triclosan e dos seus análogos otimizados, 5c, 18 e 14b.....	31
Figura 2-10: Representação das estruturas do bifosfonato, do pirofosfato, do alendronato, do risedronato, dos compostos análogos otimizados do tipo 22 e da atorvastatina.....	32

Figura 2-11: Representação das estruturas do grupo AODA e dos seus derivados, compostos 5 e 6.....	34
Figura 2-12: Representação das estruturas da orizalina, etalfluralina e trifluralina.....	35
Figura 2-13: Representação da estrutura do glifosato.....	36
Figura 2-14: Representação da estrutura do gossipol.....	38
Figura 2-15: Representação do processo de produção de poliaminas pelo <i>T. gondii</i>	38
Figura 2-16: Representação das estruturas da difluorometilornitina e da dimetilformamida.....	39
Figura 3-1: Representação da estrutura da artemisinina.....	42
Figura 3-2: Representação das estruturas dos derivados da artemisinina, a artemisona (1), o artesunato de sódio (2), o arteméter (3), o ácido artelínico (4) e o seu análogo dihidroartemisinina (5).....	44
Figura 3-3: Representação dos dois mecanismos de bioativação da artemisinina, A) Modelo da cisão redutiva e B) Modelo do peróxido aberto.....	46
Figura 3-4: Representação química da estrutura geral dos 1,2,4-trioxolanos.....	49
Figura 3-5: Representação química da estrutura dos antimaláricos OZ277 (maleato de arterolano) e do OZ439 (artefenomel).....	50
Figura 3-6: Representação química da estrutura geral de 1,2,4,5-tetraoxanos.....	51
Figura 3-7: Esquema das sínteses de trioxolanos realizadas experimentalmente.....	52
Figura 3-8: Esquema das sínteses de tetraoxanos realizadas experimentalmente.....	53
Figura 3-9: Esquema de síntese da metil-oxima a partir da adamantanona.....	53
Figura 3-10: Representação da proposta mecanística de síntese da metil-oxima IC2, partindo da adamantanona.....	54
Figura 3-11: Esquema de síntese do composto IC3.....	54
Figura 3-12: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC3.....	55

Figura 3-13: Representação da reação de conversão do composto IC2 no composto IC4.....	55
Figura 3-14: Representação da reação de conversão do composto IC4 no composto IC5.....	56
Figura 3-15: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC5.....	56
Figura 3-16: Representação da reação de conversão do composto IC4 no composto IC6.....	57
Figura 3-17: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC6, a partir de IC4.....	57
Figura 3-18: Representação da reação de conversão do composto IC4 no composto IC7.....	57
Figura 3-19: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC7.....	58
Figura 3-20: Representação da reação de conversão do composto IC6 no composto IC8.....	58
Figura 3-21: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC8.....	60
Figura 3-22: Representação da reação de conversão do composto IC6 no composto IC9.....	60
Figura 3-23: Representação da reação de conversão do composto IC5 no composto IC10.....	61
Figura 3-24: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC10.....	61
Figura 3-25: Representação da reação de conversão do composto IC5 no composto IC11.....	62
Figura 3-26: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC11.....	62
Figura 3-27: Representação da reação de síntese do composto IC1.....	63
Figura 3-28: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC1.....	63
Figura 3-29: Representação da reação de síntese do tetraoxano IC12.....	63

Figura 3-30: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC12.....	64
Figura 3-31: Representação da reação de síntese do tetraoxano IC13.....	64
Figura 3-32: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC13.....	64
Figura 3-33: Representação da reação de síntese do tetraoxano IC14.....	65

Abreviaturas

ACP-Proteína Portadora de Acilo, do inglês: *Acyl Carrier Protein*

ACN-Acetonitrilo

ADH-Arginina Derivada do Hospedeiro do inglês: *Host Derived Arginine*

ADME-Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

ADN-Ácido Desoxirribonucleico

ART-Artemisinina

Asn130-Asparagina 130

ATP-Trifosfato de Adenosina, do inglês: *Adenosine Triphosphate*

ATPase-Adenosinatrifosfatase

Boc-Tert-butoxicarbonilo

CCMAR-Centro de Ciências do Mar

CDC-*Centers for Disease Control*

CD4+-Cluster of Differentiation

Células NK-Células “*Natural Killer*”

Células NKT-Células T “*Natural Killer*”

CH₂O₂-Ácido fórmico

CH₃ONH₂-Hidrocloreto de metoxilamina

Cl-Ms-Cloro de mesilo

DCM-Diclorometano

DHFR-Dihidrofolato Redutase

DHPS-Dihidropteroato Sintase

DMF-Dimetilformamida

DMFO-Difluorometilornitina

Síntese de trioxolanos e tetraoxanos com potencial atividade contra *Toxoplasma gondii*.

ECDC-*European Centre for Disease Prevention and Control*

EDC-1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

ELISA-Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do inglês: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPSP-Enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase

ERE-Elementos de Resposta ao Estrogénio, do inglês: *Estrogen Response Elements*

ER- α -Recetor de estrogénio alfa, do inglês: *Alpha Estrogen Receptor*

ER- β -Recetor de estrogénio beta, do inglês: *Beta Estrogen Receptor*

Et₂O-Éter dietílico

EUA-Estados Unidos da América

FDA-*Food and Drug Administration*

Fe-Ferro

FPPS-Farnesil Pirofosfato Sintase, do inglês: *Farnesyl Pyrophosphate Synthase*

GTP-Trifosfato de Guanosina, do inglês: *Guanosine-5'-Triphosphate*

HBF₄-Ácido fluorobórico

HCl-Ácido clorídrico

HDAC-Histona Deacetilase, do inglês: *Histone deacetylases*

HIV-Vírus da Insuficiência Humana, do inglês: *Human Immunodeficiency Virus*

HOBt-Hidroxibenzotriazol

H₂O-Água

H₂O₂-Peróxido de hidrogénio

IEL-Linfócitos Intraepiteliais, do inglês: *Intraepithelial Lymphocytes*

IFN- γ -Interferão γ , do inglês: *Interferon Gamma*

IgA-Imunoglobulina A

IgE-Imunoglobulina E

Síntese de trioxolanos e tetraoxanos com potencial atividade contra *Toxoplasma gondii*.

IgG-Imunoglobulina G

IgM-Imunoglobulina M

IL-12-Interleucina 12

IL-15-Interleucina 15

ISAGA-Teste de Imunoabsorção-Aglutinação, do inglês: *Immunosorbent Agglutination Assay*

KOH-Hidróxido de potássio

LDH-Lactato Desidrogenase, do inglês: *Lactic Acid Dehydrogenase*

LiBH₄-Tetrahidroborato de lítio

LiB(Et)₃H-Trietil-hidroborato de lítio

MAT-Teste de Aglutinação Modificada, do inglês: *Modified Agglutination Test*

MeOH-Metanol

MIC2-Proteínas dos Micronemas, do inglês: *Micronemal proteins*

mol - Mole(s)

NaCl-Cloreto de sódio

NADH-Forma reduzida de Fosfato de Dinucleótido de Adenina e Nicotinamida, do inglês: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

NaOH-Hidróxido de sódio

N-MM-N-metilmorfolina

NO-Óxido Nítrico, do inglês: *Nitric Oxide*

O₃-Ozono

OMS-Organização Mundial de Saúde

pABA-Ácido *para*-Aminobenzoico, do inglês: *para-Aminobenzoic Acid*

PCR-Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês: *Polymerase Chain Reaction*

PEF-*Penetration Enhancing Factor*

Síntese de trioxolanos e tetraoxanos com potencial atividade contra *Toxoplasma gondii*.

PfCRT-Transportador de Resistência à Cloroquina de *P. falciparum*, do inglês: *Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter*

PMN-Leucócitos Polimorfonucleares, do inglês: *Polymorphonuclear leukocyte*

PPi-Fosfato Inorgânico, do inglês: *Phosphate Inorganic*

PPi-PFK-Fosfofrutocinase Dependente de Fosfato Inorgânico, do inglês: *PPi Dependent Phosphofructokinase*

P. cynomolgi-*Plasmodium cynomolgi*

P. falciparum-*Plasmodium falciparum*

P. vivax-*Plasmodium vivax*

SSA-Sílica de ácido sulfúrico, do inglês: *Silica Sulfuric Acid*

SERCA-ATPase Envolvida no Transporte de Ca^{2+} no Retículo Endoplasmático, do inglês: *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase*

SIDA-Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês: *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

SNC-Sistema Nervoso Central, do inglês: *Central Nervous System*

SNP-Polimorfismo de Nucleótido Único, do inglês: *Single Nucleotide Polymorfism*

SSTAT-Espermidina/Espermina N-Acetil Transferase, do inglês: *Spermidine/Spermine-N-Acetyl Transferase*

StAR-Proteína Reguladora Esteroidogénica Aguda, do inglês: *Steroidogenic acute regulatory protein*

T.a-Temperatura ambiente

t-butOK-Tert-butóxido de potássio

TEA-Trietanolamina

TGF- β -Fator Beta Transformador de Crescimento, do inglês: *Transforming Growth Factor-Beta*

T. gondii-*Toxoplasma gondii*

Síntese de trioxolanos e tetraoxanos com potencial atividade contra *Toxoplasma gondii*.

THF-Tetrahidrofurano

TLC-Cromatografia em Camada Fina, do inglês: *Thin-layer Chromatography*

TNF- α -Fator de Necrose Tumoral Alfa, do inglês: *Tumor Necrosis Factor-Alpha*

1 Introdução

1.1 Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma infecção parasitária negligenciada provocada por parasitas da espécie *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório pertencente à família Sarcocystidae e ao filo Apicomplexa. Este filo também inclui outros géneros clinicamente importantes, tais como o *Plasmodium spp.* (malária), *Cryptosporidium spp.* (criptosporidiose) e *Eimeria spp.* (coccidiose aviária). O *T. gondii* provoca infeções numa panóplia de animais de sangue quente, incluindo mamíferos terrestres e marinhos, humanos e várias espécies de aves, causando uma vasta gama de síndromes.¹⁻⁴

A toxoplasmose é adquirida pelo homem através do consumo de carne deficientemente cozinhada que contenha cistos teciduais, pela ingestão de vegetais, produtos lácteos e água contaminados com oocistos, que são gerados no intestino de felinos e libertados no meio ambiente através das fezes. Também o contacto direto com as fezes contaminadas é uma importante fonte de contaminação.^{3,5,6}

Os indivíduos saudáveis que são infetados pelo *T. gondii* geralmente não desenvolvem sintomatologia porque o seu sistema imunológico impede que o parasita provoque a doença. Quando a doença ocorre, a sintomatologia é semelhante à da gripe, com duração que varia entre escassas semanas e meses. No entanto, o parasita permanece inativo no organismo e pode ser reativado se o indivíduo se tornar imunocomprometido.⁵ Nestes casos, o parasita pode induzir consequências mais graves, incluindo encefalite provocada pelos danos no sistema nervoso central, infeções pulmonares e oculares.³ Por outro lado o *T. gondii* pode atravessar a placenta provocando abortos ou malformações congénitas, se a mãe for infetada pela primeira vez pouco tempo antes, ou durante a gravidez.¹

1.1.1 História

O *Toxoplasma gondii* foi descoberto no mesmo ano, em 1908, por cientistas que trabalhavam na Tunísia e no Brasil.^{7,8} Nicolle e Manceaux estudavam a *Leishmania spp.*

na Tunísia quando acidentalmente descobriram o *T. gondii*, tendo sido os primeiros a descrever as formas de um taquizoítio num roedor.^{7,9} Uma vez que o parasita apresenta uma morfologia semelhante à de um arco (“do grego: toxo = arco; plasma = criatura”), estes cientistas nomearam o seu género de *Toxoplasma*.⁹ Já no Brasil, Splendore, identificou o parasita no tecido de um coelho. Castellani, Fedorovitch, Chalmers e Kamar foram os primeiros a descrever um parasita parecido ao *T. gondii*, potencialmente patogénico para os seres humanos, e também reconheceram que as crianças infetadas congenitamente apresentavam como sintomas a hidrocefalia, a retinocoroidite e a encefalite. Contudo, estes casos foram estudados de forma incompleta e existe a possibilidade de os mesmos derivarem de *Leishmania spp.*¹⁰ Finalmente, em 1939, Cowen, Wolf e Paige conseguiram provar que o *T. gondii* pode ser transmitido dos animais para os humanos, ao verificarem a existência do protozoário no decorrer de uma autópsia de uma menina que havia desenvolvido convulsões e coriorretinite. Posteriormente, Sabin removeu amostras de tecido proveniente do córtex cerebral e da medula espinhal que foram homogeneizadas em soro fisiológico e inoculadas intracerebralmente em coelhos e em ratos. Estes animais desenvolveram encefalite provocada por *T. gondii*. Com esta experiência, Sabin concluiu que a estirpe infecciosa para os humanos era morfológicamente e imunologicamente similar às estirpes infetantes dos isolados de outros animais.^{11,12} Posteriormente, nos anos 40, Pinkerton e Weinman lançam um relatório no qual descreveram detalhadamente evidências morfológicas das lesões causadas pelo *T. gondii* a nível do sistema nervoso central, miocárdio, fígado, baço, pele, gânglios linfáticos, medula óssea, glândulas supra-renais e rins dum indivíduo peruano infetado.^{10,11} Dois anos depois, Sabin e Warren realizaram os primeiros estudos que provaram a eficácia das sulfonamidas no tratamento da toxoplasmose.¹³ A descoberta de um teste sorológico em 1948, composto por anticorpos específicos para o *T. gondii* e usando o corante *Sabin-Feldman*, permitiu reconhecer que este parasita é comum em hospedeiros de sangue quente, cuja infeção resultante envolve uma ampla distribuição mundial pelos humanos.^{8,11,14} Este foi o primeiro teste de serodiagnóstico, sendo específico e sensível na deteção do parasita.¹⁵

A partir da década de 50 também a importância veterinária de *T. gondii* se tornou conhecida, perante evidências de que infeções pelo parasita causavam abortos em ovinos na Nova Zelândia, o que levantou questões sobre novas rotas de transmissão do parasita.^{7,8}

Em 1965, Fulton, disponibilizou um teste de aglutinação direta para deteção de

anticorpos de *T. gondii*.¹⁶ Este teste foi posteriormente alterado para teste de aglutinação modificada (MAT) por Desmonts e Remington, sendo utilizado para o diagnóstico de toxoplasmose em animais.³ Em 1968 Remington concluiu que a detecção de anticorpos IgM no sangue do cordão umbilical ou no soro infantil seria útil no diagnóstico da mesma.^{11,17}

No decurso de uma experiência dirigida por Dubey, Frenkel e Miller, em 1970, foi isolado o parasita a partir das fezes de gatos que tinham comido ratos infetados, concluindo que o gato é o hospedeiro definitivo do mesmo.^{7,9,18} Os oocistos de *T. gondii* são excretados nas fezes dos gatos, infetando posteriormente hospedeiros intermediários.^{7,18} Só após ter sido conhecido o ciclo de vida do protozoário é que este foi definido como um parasita coccidiano.^{9,18,19} A toxoplasmose foi detetada em animais marinhos, essencialmente em lontras, o que aponta para a contaminação marinha com oocistos de *T. gondii* por um mecanismo ainda mal compreendido.^{8,20} Na década de 70, Desmonts e Couvreur fizeram um estudo com um grupo de grávidas infetadas e não tratadas, em comparação com um grupo de grávidas infetadas e tratadas com espiramicina, concluindo que este antibiótico tem atividade antitoxoplasmática. O benefício terapêutico deve-se à ação do antibiótico fora da placenta, sendo por esta razão usado profilaticamente em grávidas, para reduzir a transmissão do parasita da mãe para o feto.^{11,21}

A suscetibilidade dos indivíduos imunocomprometidos à toxoplasmose foi comprovada pelo grupo de Snider,²² num estudo realizado em 1983 que englobou 50 pacientes com SIDA, dos quais 31 desenvolveram infeções no SNC.²² A primeira detecção do ADN de *T. gondii* foi realizada através da amplificação do gene B1, usando PCR, e só ocorreu no ano de 1989. No geral, esta técnica tem se mostrado muito útil no diagnóstico da toxoplasmose clínica.²³ A nível farmacológico, Engstrom realizou um estudo com vários regimes terapêuticos, no qual concluiu que o regime que obteve um maior número de respostas positivas para tratar a toxoplasmose ocular englobava pirimetamina/ácido folínico, sulfadiazina e prednisona.²⁴

1.1.2 Epidemiologia

A incidência da toxoplasmose no mundo, representada na Figura 1-1, é bastante variável, estimando-se que mais de 6 bilhões de pessoas tenham sido infectadas por *T. gondii*.^{25,26} A seroprevalência dos anticorpos contra este parasita diversifica-se bastante entre países, e muitas vezes dentro de um determinado país, ou mesmo entre diferentes comunidades na mesma região.²⁷

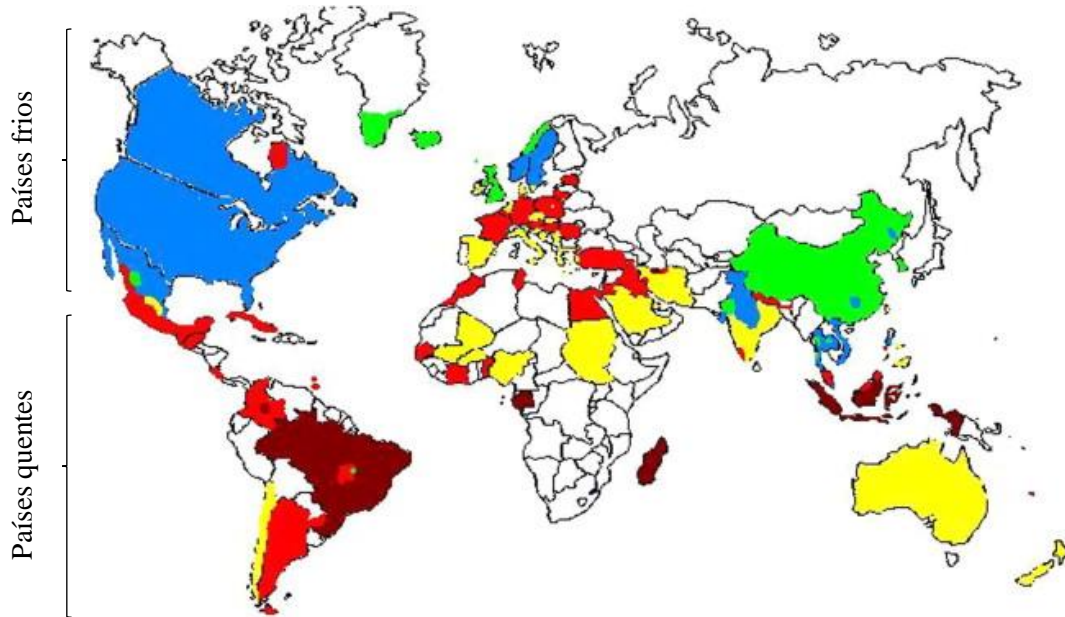


Figura 1-1: Estado global da seroprevalência de *Toxoplasma gondii*. O vermelho escuro corresponde a zonas em que a incidência da infecção se encontra acima de 60%, o vermelho claro está associado a zonas com uma prevalência entre 40-60%, o amarelo 20-40%, o azul 10-20% e o verde equivale a zonas com uma prevalência inferior a 10%. O branco exprime a ausência de dados. (Adaptado de²⁷)

De acordo com os resultados obtidos num estudo realizado por Pappas, Roussos e Falagas, em 2009, existem zonas denotadas com uma prevalência de *T. gondii* elevada, nomeadamente a América Latina, algumas zonas da Europa, do Médio Oriente Asiático e também nalguns locais do sudeste da Ásia e África, sugerindo que nestas zonas a replicação sexual do parasita ocorre com mais frequência do que nas outras partes do mundo.^{25,27} Em contraste, verifica-se uma menor tendência de seroprevalência em muitos países europeus e nos Estados Unidos da América.²⁷ Esta distribuição do parasita é resultante das variações climáticas entre países que afetam a sobrevivência dos oocistos no meio ambiente e, como consequência, influenciam as taxas de infecção. Neste sentido, observam-se prevalências mais elevadas em países tropicais, com clima húmido e ameno,

contrariamente ao que ocorre em países áridos ou em países mais frios, em que a prevalência do parasita é menor.²⁸

Segundo os dados obtidos em 2014 pela ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*), a incidência da toxoplasmose na Europa foi cinco vezes menor que a registada no ano 2013. A Polónia (48%) e o Reino Unido (26%) foram os países onde se detetou o maior número de casos. A distribuição mais prevalente do parasita em países que não favorecem a reprodução do mesmo devido às baixas temperaturas pode ser explicada pela emigração de indivíduos residentes em países mais húmidos e amenos para países mais frios. No caso da Polónia, o contato com carne crua de animais contaminados por *T. gondii*, especialmente suínos, é a fonte mais comum de infeções humanas.^{29,30} Todavia, são poucos os países da União Europeia que realizam estudos sobre a prevalência da toxoplasmose congénita e 35% dos países não possuem dados de toxoplasmose. Dada a escassez de informação, não é possível obter uma estimativa credível da prevalência desta patologia na Europa.³¹ Em relação às variações regionais de seroprevalência no mesmo país, estas resultam de diferenças no nível socioeconómico e cultural das subpopulações, como é o caso do Brasil, onde a seroprevalência dos anticorpos contra *T. gondii* varia de 20% a >90%, entre diferentes grupos.³²

A seroprevalência global da toxoplasmose está em constante evolução, sendo de frisar que grande parte das variações existentes da mesma são explicadas por fatores antropogénicos, incluindo hábitos alimentares (práticas de cozinha, higienização das mãos, tipos de carne ou legumes consumidos e limpeza de vegetais), parâmetros socioeconómicos, hábitos populacionais, qualidade da água e cobertura sanitária.^{27,28} Também a presença de condições imunossupressoras afeta o desenvolvimento da toxoplasmose bem como as diferenças na virulência das estirpes de *T. gondii* encontradas em todo o mundo. Por comparação, 1 a 2% dos indivíduos infetados com *T. gondii* desenvolveram doença ocular nos EUA, enquanto que no Brasil as doenças oculares atingiram uma incidência de 20%. Este dado permitiu concluir que as estirpes do parasita no Brasil são mais virulentas.³³ A presença do parasita no soro aumenta em grupos populacionais que vivem em más condições de higiene, sendo a água uma fonte importante da infeção humana, especialmente em áreas onde os humanos usam água não filtrada para consumo.²⁸

O aumento dos níveis socioeconômicos, bem como a melhoria das condições de higiene, o aumento dos recursos médicos, as mudanças nos sistemas agrícolas, o consumo de carne congelada e a alimentação dos gatos com alimentos esterilizados, levaram a uma diminuição contínua da seroprevalência em países mais industrializados.²⁸ Neste âmbito, a consciência das causas que provocam uma infecção por parasitas *T. gondii* pode conduzir a que sejam aplicadas políticas de saúde pública adequadas, tendo como alvo preferencial mulheres seronegativas em idade fértil e residentes em áreas de alta seroprevalência.²⁷

1.1.3 Parasita

O *Toxoplasma gondii* é uma das cerca de 5000 espécies de parasitas protozoários intracelulares obrigatórios pertencentes à filo Apicomplexa.^{34,35} Corresponde a um eucariota unicelular com um ciclo de vida heteroxeno, contendo hospedeiros definitivos e também hospedeiros intermediários. Este coccídeo é um dos parasitas mais poliméricos conhecidos até o momento, uma vez que a sua constituição envolve um conjunto de estruturas responsáveis por infectar animais de sangue quente. No entanto, muitos aspectos relacionados com a biologia, o ciclo de vida natural e a epidemiologia das infecções provocadas pelo *T. gondii* são ainda relativamente pouco conhecidos.^{35,36}

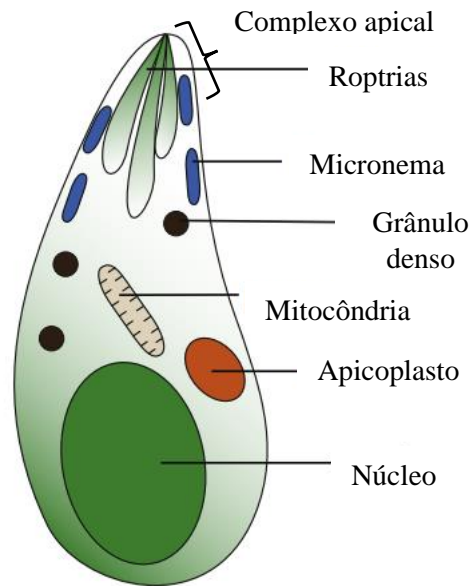


Figura 1-2: Representação da morfologia dos parasitas da filo Apicomplexa (Adaptado de³⁴)

A maioria dos parasitas Apicomplexa possui um conjunto de estruturas do citoesqueleto essenciais para a sua sobrevivência e patogênese (Figura 1-2). Todos os parasitas pertencentes a esta filo são constituídos por uma extremidade apical que é utilizada para invadir a célula hospedeira. O complexo apical é construído em torno do conóide, um compartimento constituído por um conjunto de fibras dispostas em espiral, que se alongam e retraem durante a invasão da célula hospedeira. Esta região fornece fatores essenciais para a fixação, invasão e subsequente formação do vacúolo parasitóforo no qual o parasita se encontra. Durante a replicação do parasita, o primeiro sinal que

demonstra a formação de novos descendentes é a construção de novos conóides e também do complexo apical, estruturas estas que servem como um ponto essencial para a montagem do citoesqueleto e da membrana do novo parasita.³⁵

Algumas espécies de Apicomplexa, como o *T. gondii* e o *Plasmodium*, também possuem um apicoplasto, um organelo responsável por processos metabólicos específicos, como a síntese de ácidos gordos.³⁷

1.1.4 Ciclo de vida de *T. gondii*

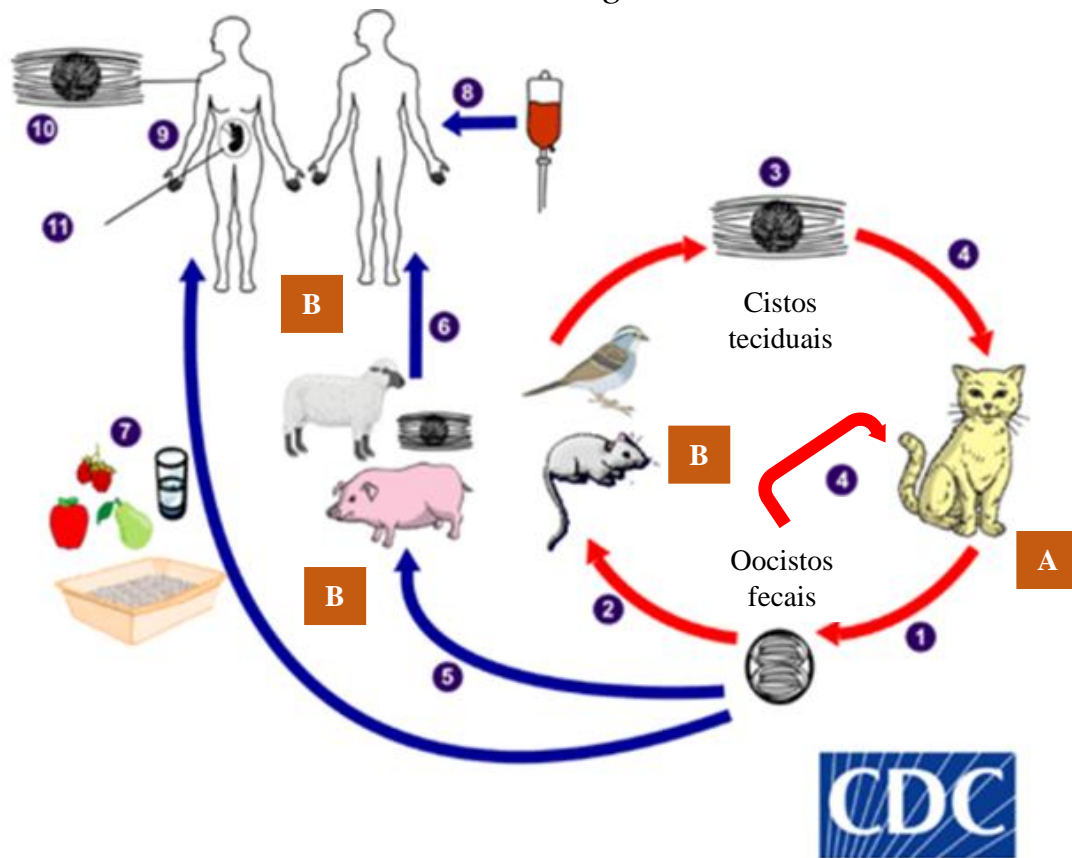


Figura 1-3: Representação do ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* no hospedeiro definitivo e nos hospedeiros intermediários. (Adaptado de⁵)

O ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* é dividido entre infecções no hospedeiro definitivo (A-animais felinos) e nos hospedeiros intermediários (B-animais de sangue quente), que diferem entre si.³⁸ Os felinos são os únicos animais onde ocorre a fase sexual do ciclo de vida de *T. gondii*, mais concretamente nas células epiteliais do

intestino do animal. Já a fase assexuada ocorre após a invasão do coccídeo nos tecidos de qualquer hospedeiro de sangue quente, inclusive nos animais felinos e no ser humano.³⁹

Os gatos pertencem à família Felidae e são o único hospedeiro definitivo conhecido para o *T. gondii*, sendo a principal fonte de contaminação dos hospedeiros intermediários.^{5,40} Este felino, após ter sido contaminado, excreta milhões de oocistos nas suas fezes a cada 1-3 semanas **(1)**. O oocisto necessita de 1 a 5 dias no ambiente para maturar, tornando-se infeccioso através do processo de esporogonia. Neste processo ocorre a diferenciação interna do oocisto em dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos.^{39,41} Se a maturação não ocorrer, o oocisto, ao ser ingerido, não será infeccioso.⁴ Esta forma parasitária, em condições ambientais favoráveis, mantém-se infetante por longos períodos, em média entre 12 a 18 meses e até mesmo durante anos no solo, o que favorece a contaminação de outros animais.^{5,39,40}

Os hospedeiros intermediários **(B-pássaros e roedores)** são infetados após a ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos **(2)** e é no interior do organismo destes animais que ocorre o ciclo assexuado.⁴² Os esporozoítos infecciosos, libertados após o oocisto ser degradado pelas enzimas digestivas, penetram a mucosa intestinal e invadem os enterócitos.⁴² Nestas células, multiplicam-se assexuadamente e formam taquizoítos por um processo denominado por endodiogenia.^{5,41} A produção de taquizoítos corresponde à fase aguda da infeção que é definida pela multiplicação rápida desta forma.³⁸ A membrana plasmática da célula hospedeira acaba por romper, libertando os taquizoítos no compartimento extracelular, que por sua vez infetam outras células vizinhas, dando continuidade à replicação intracelular.⁴³ Os taquizoítos disseminam-se pelo sistema linfático e pelo sangue, bem como por todo o corpo, particularmente para os tecidos neurais e musculares dos hospedeiros. Nos tecidos os taquizoítos transformam-se cada vez mais lentamente, dando origem à fase crónica do ciclo, após 7 a 10 dias do início da infeção. Nesta fase os taquizoítos modulam-se em bradizoítos, que são envoltos pelos cistos **(3)**.^{5,41} Esta forma infecciosa tem a capacidade de residir no hospedeiro durante toda a vida do mesmo.^{5,38}

O gato pode ser contaminado de diversas formas **(4)**, como por exemplo pela ingestão de presas contaminadas com cistos teciduais ou pela deglutição de oocistos esporulados, transmitidos a partir das suas próprias fezes ou das fezes de outros gatos.^{40,41} No interior do organismo do gato vai ocorrer a fase assexuada e a fase sexuada do parasita,

nas células epiteliais do intestino do mesmo.^{39,41} A parede do cisto tecidual de *T. gondii* é degradada pelas enzimas proteolíticas, libertando os bradizoítos no intestino delgado do gato,⁴³ que por sua vez invadem as células intestinais, onde sofrem multiplicação assexuada (esquizogonia), produzindo os merozoítos. O rompimento da célula parasitada liberta os merozoítos no lúmen do intestino delgado, sendo que alguns destes entram nos tecidos extraintestinais, formando cistos teciduais em vários órgãos do corpo,⁴¹ enquanto os outros se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos, dando início ao ciclo sexual (gametogonia).^{39,41} O microgâmeta masculino é móvel e fecunda o macrogâmeta feminino, imóvel, formando o zigoto, que após alguns dias rompe e liberta o oocisto imaturo.³⁹ Quanto mais oocistos houver no ambiente, mais provável é as presas serem infetadas, o que proporciona um aumento das taxas de infecção em gatos, num ciclo que se vai prolongando.⁴⁰ Animais criados para consumo humano e animais selvagens derivados da caça também podem ser infetados com cistos teciduais ou após terem ingerido oocistos esporulados existentes no ambiente (5).⁵

A via de transmissão mais comum de *T. gondii* para o ser humano (6) consiste na ingestão de cistos teciduais contidos na carne de outras espécies hospedeiras intermediárias, nomeadamente de carne de mamíferos insuficientemente cozida (B-ovelha, vaca e porco).⁴² O ser humano (9) pode ainda ser infetado quando ingere alimentos ou água contaminados com fezes de gatos, ou mesmo por amostras ambientais contaminadas (como o solo contaminado com fezes ou a troca da caixa de areia de um gato de estimação) (7). Também as transfusões de sangue e o transplante de órgãos (8), bem como a passagem do parasita através da placenta materna para o feto (11), são possíveis formas de contaminação. No hospedeiro humano, os parasitas formam cistos teciduais (10), principalmente no músculo esquelético, miocárdio, cérebro e olhos, que por sua vez podem permanecer por toda a vida do hospedeiro.⁵

1.1.5 Transmissão

O *Toxoplasma gondii* infeta cerca de um terço da população mundial. Este coccídeo tem a capacidade de contaminar os hospedeiros por três vias principais, a ingestão de cistos teciduais presentes em carne insuficientemente cozinhada ou crua, ingestão de oocistos esporulados e transmissão congénita da mãe infetada para o feto

durante a gestação. Os hospedeiros mecânicos que têm contato com solo, água ou culturas contaminadas, como é o caso das minhocas e das amebas, também desempenham um papel fundamental na disseminação. Estes animais promovem a contaminação do meio ambiente, tornando-se numa importante rota de infecção para humanos e animais.⁴⁴ A transmissão do parasita também pode surgir da ingestão de bebidas, incluindo o leite materno, da exposição a solos ou fossas, da geofagia, bem como do consumo de bivalves ou mariscos.^{29,45} Também o consumo de frutas e vegetais não lavados, a realização de transfusões de sangue ou transplantes, o contacto com fluídos corporais (expetoração) e a passagem materno-fetal de células sanguíneas (incluindo trofoblastos da placenta) são fatores que aumentam a probabilidade de transmissão.^{29,46} Padrões de higiene deficientes, meios socioeconómicos desfavorecidos e menor acesso à educação, são indicadores que também podem contribuir para uma maior taxa de infecção.²⁹ Mais recentemente surgiram estudos epidemiológicos que sugerem uma maior prevalência da toxoplasmose em mulheres casadas comparativamente às mulheres sem parceiros, na mesma região. Estes resultados indicam que a toxoplasmose pode ser também transmitida sexualmente o que é suportado pelo facto de ter sido detetado ADN de *T. gondii* em amostras de esperma.⁴⁷

1.1.6 Sintomatologia

A toxoplasmose pode ser categorizada em 4 grupos: a adquirida pelo paciente imunocompetente, a adquirida ou reativada no paciente imunodeficiente, a ocular e a congénita.⁴⁸

Os indivíduos imunocompetentes que posteriormente são infetados pelo *Toxoplasma gondii* raramente apresentam sintomas porque o seu sistema imunológico impede o parasita de causar a doença.⁵ Quando esta ocorre, geralmente é leve e com sintomas semelhantes aos da gripe, como a febre, dores musculares, cansaço, dor de garganta e glândulas inchadas. O curso clínico é normalmente autolimitado, e no prazo de 6 semanas estes sintomas acabam por desaparecer.⁴⁹

No entanto, se o indivíduo se tornar imunocomprometido devido à disfunção ou supressão do sistema imunológico e o parasita já existir no organismo num estado inativo, este pode ser reativado ou poderá ocorrer a infecção por *T. gondii* pela primeira vez.⁵ Em situações de indivíduos com SIDA, pacientes em fase de tratamentos quimioterápicos

com agentes citotóxicos ou após terem realizado um transplante de órgão, as consequências da toxoplasmose são mais graves, podendo resultar em morte. Nestes doentes é muito comum observar o desenvolvimento de complicações a nível do SNC como dores de cabeça, confusão, coordenação deficiente e convulsões. Outros órgãos como os pulmões, o coração e os olhos podem também ser infetados pelo parasita.⁴¹

A toxoplasmose congénita consiste na transmissão materna de *T. gondii* para a circulação fetal, maioritariamente por infeção da placenta.⁴⁸ Além do bebé poder ser contaminado através da placenta, também o momento do parto pode conduzir ao aparecimento da infeção, devido ao contato do feto com a vagina. O risco de transmissão da infeção para o feto é dependente do momento em que a infeção materna ocorreu. Quando a infeção materna é adquirida antes da gestação o risco de transmissão para o feto será mínimo ou mesmo nulo.⁵⁰ No entanto, algumas mulheres grávidas com infeção crónica de *T. gondii*, poderão infetar o feto, caso ocorra a reativação do parasita durante a gravidez.⁴¹ Nos casos em que a infeção é adquirida na época da conceção ou nas primeiras 2 semanas de gestação, a toma de espiramicina impede a transmissão da doença ao feto. Por fim, quando a infeção ocorre no último trimestre as taxas de transmissão são superiores a 60%. Apesar da transmissão precoce da infeção ser rara, esta correlaciona-se com o aumento da severidade dos sintomas da infeção no feto.⁵⁰ Neste sentido, quando a infeção materna ocorre no primeiro e segundo trimestres as manifestações da toxoplasmose congénita são mais graves,⁵¹ podendo provocar a morte do feto no útero e, posteriormente, um aborto espontâneo, natimorto ou sequelas neurológicas graves no recém-nascido. Já a infeção materna tardia (terceiro trimestre) na maioria das vezes resulta em recém-nascidos com aparência normal, sendo que apenas um número restrito de bebés com toxoplasmose mostra um amplo espectro de sinais da doença no nascimento.⁴⁸ As crianças infetadas sem que a doença se manifeste acabam por desenvolver coriorretinite (geralmente bilateral), estrabismo, cegueira, hidrocefalia ou microcefalia, calcificações cerebrais, atraso no desenvolvimento, epilepsia ou surdez, hepatoesplenomegalia e/ou icterícia, meses ou anos após o nascimento.⁵² Destes sintomas destacam-se a coriorretinite, as calcificações intracranianas e a hidrocefalia, tidas como a tríade clássica desta patologia.⁵⁰ No número reduzido de recém-nascidos em que a prevalência da doença é evidente, infeções oculares graves, hepatoesplenomegalia, icterícia e pneumonia são os principais sintomas.⁵²

A toxoplasmose ocular é resultado de infecção adquirida ou, mais comumente, da infecção congénita.⁵³ Esta patologia pode desenvolver-se durante a fase aguda da infecção, mas surge maioritariamente durante recorrências da fase crónica. Estudos indicaram que a prevalência de recorrências múltiplas de toxoplasmose ocular atingiu 79% dos doentes durante 5 anos de acompanhamento.⁵⁴ Os fatores responsáveis pelo surgimento destas recorrências são desconhecidos, mas o trauma, as alterações hormonais e a imunossupressão contribuem para a libertação de *T. gondii* a partir dos seus cistos teciduais.⁵⁵

A toxoplasmose ocular é a causa mais comum de uveíte em todo o mundo sendo que a manifestação ocular mais frequente é a coriorretinite podendo envolver ou não a mácula.⁵⁶ Ao contrário do ocorrido na toxoplasmose congénita, em que o envolvimento da mácula é frequente, na doença ocular adquirida apenas cerca de 15% dos casos apresentam lesões a esse nível. Tal dado confere ao primeiro caso singularidade devido à localização do foco de coriorretinite.⁵⁷ Quando o parasita atinge o olho, vai produzir lesões que começam nas camadas superficiais da retina, em seguida atingem o epitélio de pigmentação da retina e posteriormente a coróide.^{53,58} A apresentação clínica clássica de uma lesão ativa corresponde a um foco elevado de coriorretinite necrosante adjacente a uma cicatriz pigmentada.^{53,58} A lesão pode permanecer ativa por várias semanas, sofrer cicatrização e formar uma cicatriz pigmentada na retina. A resposta imune do hospedeiro induz a conversão dos taquizoítos a bradizoítos e o seu posterior encistamento nos tecidos de forma a dificultar a sua deteção por parte do sistema imunitário do indivíduo. O cisto pode permanecer inativo na cicatriz ou nas proximidades, por muito tempo. No entanto, quando o cisto se rompe existe a libertação de *T. gondii* na retina circundante, o que conduz a uma reativação da retinite, causando dor ocular, vermelhidão e visão embaçada. Pode conduzir a danos permanentes, incluindo cegueira.⁵⁹

1.1.7 Resposta imunológica do hospedeiro

Quando os parasitas são ingeridos pelo hospedeiro, o epitélio intestinal corresponde à primeira barreira que estes enfrentam, sendo constituída por enterócitos unidos por junções apertadas.⁶⁰ Após a infecção dos enterócitos pelo *T. gondii*, o parasita multiplica-se e leva à rotura das células, libertando taquizoítos que se disseminam na corrente sanguínea, acabando por se distribuir pelos vários órgãos.⁶¹ A facilidade com

que a infecção se desenvolve deve-se ao processo de penetração celular do parasita que é mediado por um fator sintetizado pelo próprio agente invasor, o PEF (*penetration enhancing factor*).⁶² A interrupção do processo destrutivo pelo *Toxoplasma gondii* depende tanto da imunidade inata como do desenvolvimento da imunidade adquirida, que engloba a imunidade celular e a humoral.⁶³ Após ocorrer a infecção dos enterócitos pelo parasita (**a**), este consegue penetrar a mucosa intestinal através de duas vias: ou atravessa as *tight junctions* (**b**) ou infeta as células dendríticas e macrófagos (**c**). Nesta fase inicia-se a resposta inata que é mediada pelos enterócitos, células dendríticas e macrófagos já estimulados. Os enterócitos libertam óxido nítrico (NO), que atua diretamente no parasita (**d**), mas também libertam quimiocinas e citocinas, que atraem linfócitos intraepiteliais (**e**), leucócitos polimorfonucleares (**f**), macrófagos (**g**) e células dendríticas (**h**).⁶⁴ Estas células produzem a IL-12 e o TNF- α , que desencadeiam a diferenciação das células T CD4+ (**i**) após serem ativadas pela apresentação do antígeno. As células T CD4+, à semelhança do que acontece com as células NK e com as células TNK (**j**), sintetizam o IFN- γ , que ativa macrófagos, células dendríticas e enterócitos para a depuração do parasita.⁶³ Além da interleucina 12, existem outras interleucinas responsáveis por promover a produção do IFN- γ pelas células “*natural killer*” e pelos linfócitos T, como é o caso da IL-15 produzida por enterócitos infetados.⁶⁰

Os linfócitos T são também responsáveis pela proliferação e diferenciação das células B, para segregarem anticorpos que, juntamente com o complemento, controlam os níveis de parasitas extracelulares na circulação e fluidos teciduais, enquanto que a resposta celular é direcionada contra parasitas intracelulares.⁶⁵ Todos os isotipos são produzidos pelas células B estimuladas, IgM, IgG, IgA e IgE. Estes anticorpos são conhecidos por uma vasta gama de funções, incluindo o bloqueio da invasão celular, a lise dos parasitas e a ativação das vias do complemento. A replicação do parasita no intestino, combinada com o desenvolvimento da resposta inflamatória, podem levar a danos epiteliais, permitindo que bactérias comensais proliferem (**k**). Apesar da atividade microbicida, o IFN- γ , se não controlado, pode prejudicar a integridade intestinal. Os linfócitos intraepiteliais (IEL) que estão espalhados entre os enterócitos são citotóxicos para os próprios enterócitos infetados e possuem também como funcionalidade a produção de um fator de crescimento transformador TGF- β (**l**), que limita a produção de IFN- γ .⁶⁶

Contudo, a resposta imunológica não destrói o parasita na totalidade, pois este

assume a forma de cisto em tecidos imunoprivilegiados, como a medula espinal, o cérebro, os músculos e os olhos, onde a imunidade é menos efetiva, comparativamente aos tecidos viscerais. Nestes tecidos o parasita mantém-se viável durante longos períodos, ou mesmo durante toda a vida do hospedeiro, sem desencadear uma resposta inflamatória.⁶⁷ Alterações na função imunológica do hospedeiro podem reativar a infecção crónica e, nos doentes imunodeprimidos, as lesões derivadas da multiplicação descontrolada do parasita serão graves.⁶⁸

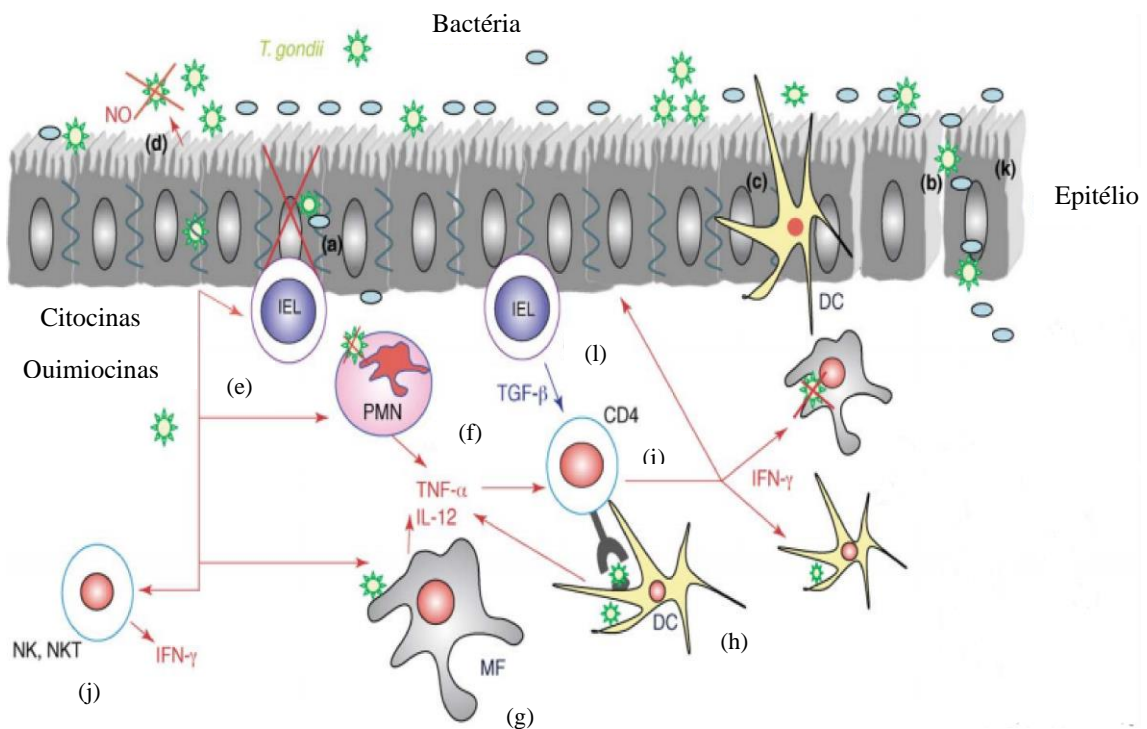


Figura 1-4: Representação da resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro contra *T. gondii*. (Adaptado^{60,69})

1.1.8 Diagnóstico

Uma vez que na maioria dos indivíduos a infecção é assintomática, o diagnóstico clínico da toxoplasmose é difícil. A toxoplasmose pode ser detetada com o auxílio de várias técnicas, desde métodos indiretos, como é o caso da deteção de anticorpos, a métodos diretos realizando a deteção de ADN ou dos parasitas. De todas as técnicas, os métodos sorológicos são os mais utilizados.⁷⁰ Os diferentes ritmos cinéticos de produção de anticorpos ajudam a definir o estágio da infecção. As IgMs são os primeiros anticorpos a surgir, geralmente 1 semana após a infecção. Os níveis deste anticorpo crescem,

atingindo um pico no primeiro mês e decrescendo em seguida, até deixarem de existir. Todavia, uma parte da população (9–27%) exhibe uma resposta persistente das IgM durante um período duradouro, sugerindo que um resultado de IgM positivo pode resultar de infecções agudas, recentes ou mais antigas.^{61,71} A IgG surge 2 semanas após a infecção e atinge um pico após 3 meses. Em seguida, os seus níveis permanecem constantes durante 6 meses e após 1 ano começam a diminuir lentamente, mantendo-se em níveis residuais até ao final da vida do infetado, pois os cistos latentes persistem no organismo em órgãos imunoprivilegiados.⁶¹ Atualmente, a deteção sorológica dos níveis de anticorpos IgM e IgG é a base para identificar a existência da infecção.⁷¹ No entanto, um resultado de IgM positivo, apesar de indicar uma infecção aguda, não fornece informação precisa sobre o momento em que a infecção foi contraída, tendo sido desenvolvidos testes para estimar a data da infecção sem analisar a curva de ascensão dos anticorpos. O teste mais utilizado para este fim é o teste de avididade de IgG, que mede a afinidade dos anticorpos IgG por antígenos parasitários.⁷² Sabe-se que a avididade de ligação da IgG ao antígeno aumenta lentamente durante os primeiros quatro meses.⁶¹ Este teste permite diferenciar uma infecção crónica (ocorrida há mais de quatro meses e que apresenta uma avididade elevada) de uma infecção recente (ocorrida há menos de quatro meses e apresentando avididade mais baixa).⁷³ A presença de anticorpos IgA auxilia a identificação da fase aguda, pois estes anticorpos sugerem que a infecção ocorreu num período inferior a cinco meses.⁷⁴ O método mais sensível para deteção de IgA é o “*immunosorbent agglutination assay*” (ISAGA), também utilizado na deteção de IgM e tornando-se mais útil na deteção desta imunoglobulina para a confirmação da toxoplasmose.⁷⁵

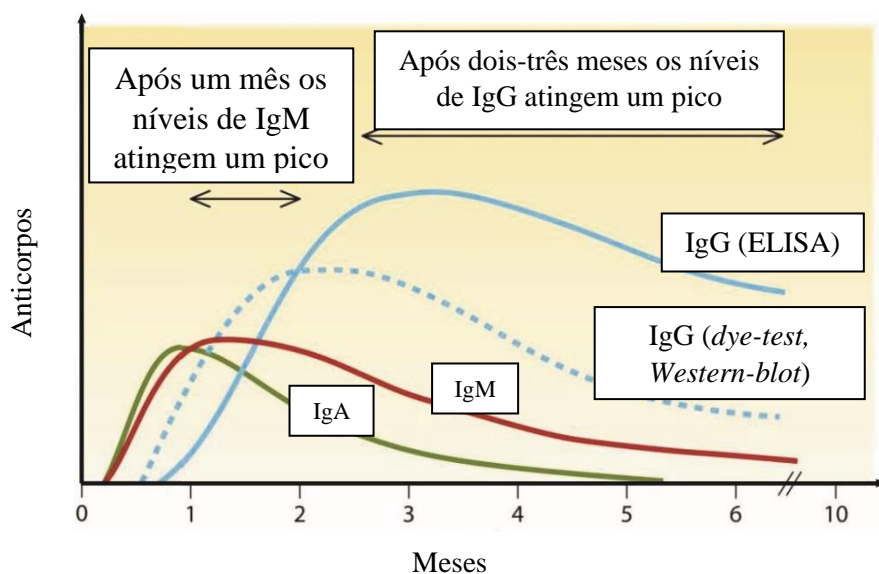


Figura 1-5: Representação dos diferentes ritmos da resposta imunológica dos anticorpos ao *T. gondii*. (Adaptado²⁸)

Em determinadas situações, como é o caso de indivíduos que irão realizar transplantes de órgãos, é necessário utilizar testes mais rigorosos, que detetem níveis mais baixos de IgG. O teste de *Sabin-Feldman* (“*dye-test*”) ou o teste de *Western-blot* são mais específicos, devendo ser impregnados para confirmar os resultados obtidos pelo teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

O diagnóstico prévio da toxoplasmose é especialmente importante nas mulheres grávidas, uma vez que os danos no feto podem ser fatais, caso exista transmissão. As grávidas que não apresentem IgG e IgM são suscetíveis à infecção e devem seguir cuidados de prevenção. Os exames devem ser repetidos nos dois trimestres seguintes, para verificar se a infecção surgiu durante a gestação. Se a gestante for IgM positiva, trata-se de uma provável infecção aguda. Após duas a quatro semanas devem ser realizados testes para confirmar a presença de IgG. Se a IgG for negativa, exclui-se o diagnóstico (IgM falso positivo); caso seja positiva, houve a seroconversão. Se a gestante for IgG e IgM positiva deve-se solicitar a dosagem de IgA (marcador de fase aguda) ou teste de avididade de IgG.⁷⁶ O diagnóstico mais frequentemente utilizado para detetar a presença da infecção congénita no feto consiste na deteção do parasita por amniocentese e cordocentese.⁷⁷ A introdução do ensaio da reação em cadeia da polimerase (PCR) permite amplificar o ácido nucleico de *T. gondii*, possibilitando a deteção do parasita, mesmo quando presente em baixos níveis. Este processo é passível de ser realizado utilizando o líquido amniótico, sendo um método de diagnóstico mais preciso e rápido.⁷⁸ O diagnóstico sorológico é difícil de conduzir em bebés, devido à alta concentração de anticorpos IgG maternos que atravessam a placenta e atingem o seu sangue. A presença de IgM e/ou IgA no sangue do bebé confirma a presença da infecção congénita, pois estas imunoglobulinas não atravessam a placenta. Com o intuito de aumentar a sensibilidade e a especificidade, aliou-se a análise de *Western Blot* para detetar IgM e IgA à PCR a partir do líquido amniótico.⁷⁹ Em doentes com SIDA, a PCR também assume elevada relevância, uma vez que é possível utilizar o líquido cefalorraquidiano para o diagnóstico da patologia.⁸⁰ A ultrassonografia é também uma técnica essencial para avaliar a morfologia fetal ao longo da gestação, sendo que a dilatação dos ventrículos cerebrais e o aumento da placenta são alterações sugestivas de toxoplasmose.⁸¹ O isolamento do parasita *in vitro* ou *in vivo* são técnicas utilizadas para determinar diretamente a presença do coccídeo. O isolamento *in vitro* envolve a inoculação de culturas de células com a amostra biológica a 37°C para posterior identificação do desenvolvimento do parasita por observação microscópica. Já

a inoculação do parasita em ratos é realizada através de uma injeção intraperitoneal de tecidos ou fluidos possivelmente contaminados. Se infetados, os ratos desenvolverão uma infecção aguda, ou uma infecção crônica caracterizada pela presença de cistos cerebrais. A fim de confirmar o diagnóstico, são realizados testes sorológicos e análises a segmentos do cérebro destes animais.⁸² Este método demonstra sensibilidade, contudo requer três a seis semanas para se obter resultados, requerendo também a manutenção de animais em biotérios.⁸³

1.1.9 Prevenção

A melhor maneira de abordar o problema da toxoplasmose consiste na adoção de medidas de intervenção em diferentes partes da cadeia de transmissão, cabendo a todos os profissionais de saúde educar a população, advertindo-a para os cuidados preventivos.⁸⁴ Recomendações para a realização de uma prevenção eficaz, que limitem a exposição dos hospedeiros a oocistos ou cistos teciduais, incluem essencialmente a prática de regras de boa higiene e evitar a exposição a fezes de gato.⁸⁵

No consumo alimentício, é de evitar ingerir leite não pasteurizado, comer bivalves crus, beber água não tratada, incluindo a de poços, ou água com potencial contaminação por fezes de gatos, e também comer frutas e legumes crus, não lavados.⁸⁶ A carne deve ser aquecida a 65,6°C antes de ser consumida, à exceção da carne moída e da carne de caça selvagem, que devem ser cozidas a 71,1°C. O aquecimento em micro-ondas não é suficiente para matar *T. gondii*.⁸⁷ Também o congelamento da carne a -20°C por pelo menos 48 horas auxilia na remoção de cistos de *T. gondii* incorporados nos tecidos da carne. No entanto, carnes que sofram técnicas como a seca, a cura em sal, ou carnes que sejam fumadas, se infetadas poderão ainda constituir uma fonte de contaminação. Não só a confecção, mas também o manuseamento das carnes necessita de cuidados, como a utilização de luvas na sua preparação e também a desinfecção das mãos após o manuseio das mesmas. O local onde é feita a preparação da carne e os utensílios utilizados devem ser desinfetados depois de terem contactado com a carne crua.

Nas indústrias alimentares de cariz animal a segurança deve ser reforçada, dado que os animais funcionam como transmissores da infecção ao ser humano, portanto deverão também ser tidas em conta as medidas preventivas que identifiquem e removam animais infetados da cadeia alimentar. Devem ser observadas as boas práticas de

produção, como manter os gatos e roedores fora das áreas de produção de alimentos e usar fontes de água tratadas para os animais.⁸⁷ Relativamente à vacinação, a vacina viva atenuada revelou eficácia na redução do aborto em rebanhos de ovelhas e também se verificou que outras vacinas vivas promoveram a redução da eliminação de oocistos pelo gato. Todavia, até à data nenhuma conseguiu eliminar totalmente o parasita.⁸⁸ Para humanos, a vacinação com estirpes virulentas vivas não é recomendada, uma vez que essas estirpes podem representar um risco para o feto e não há garantia de que não levarão à doença, particularmente em indivíduos imunossuprimidos.⁸⁷

O gato, sendo o hospedeiro definitivo do parasita, é uma importante fonte de contaminação. A infecção por *T. gondii* nos gatos pode ser evitada, desde que se tome um conjunto de precauções, tais como alimentando-os com alimentos secos, enlatados ou cozidos e impedindo-os de caçar.⁸⁹ Além disso estes animais devem ser mantidos dentro de casa, sendo que os gatos selvagens não devem ser tocados nem adotados por mulheres grávidas. Deve-se evitar contactar com o solo contaminado por oocistos de *T. gondii* derivados das fezes felinas e as caixas de areia devem ser descartadas diariamente, uma vez que o protozoário se torna infeccioso entre 1 a 5 dias depois de ser eliminado nas fezes do gato. A pessoa que executa este género de tarefas deverá utilizar luvas e lavar as mãos após o término das mesmas.⁸⁶ Os veterinários têm também um papel importante na prevenção da toxoplasmose, não só na educação dos donos de gatos sobre as medidas preventivas a tomar mas também na educação dos donos de cães. Apesar de nos cães não ocorrer o ciclo de vida completo de *T. gondii*, estes animais funcionam como transmissores da doença, sendo por este motivo necessário informar sobre a importância da vacinação contra a cinomose, já que a maioria dos casos de toxoplasmose verificam-se em cães não vacinados contra este vírus imunossupressor.⁸⁵

Visando uma maior proteção dos doentes imunodeprimidos, os profissionais de saúde devem alertar para o cumprimento das regras de higienização, de modo a evitar o desenvolvimento de doenças oportunistas, como a toxoplasmose.⁹⁰ Nos casos de transplante de coração ou de pulmão, a administração de cotrimoxazol para profilaxia da pneumocistose mostrou-se eficiente também na prevenção da toxoplasmose.⁹¹

2 Quimioterapia utilizada no combate da toxoplasmose

2.1 Quimioterapia atual contra *T. gondii*

A infecção por *T. gondii* apresenta elevada prevalência em todo o mundo e os principais regimes terapêuticos utilizados para combater o parasita evidenciam problemas ao nível da eficácia clínica, da potência e da segurança.⁹² Os fármacos usados atualmente no combate a infecções por *T. gondii* também foram usados como antimaláricos.⁹³ O regime terapêutico recomendado para o tratamento ou profilaxia da toxoplasmose consiste numa combinação de pirimetamina e sulfadiazina, que inibe o metabolismo do folato no parasita.⁹⁴ No entanto, estes fármacos apresentam efeitos colaterais, como neutropenia, diminuição de plaquetas, trombocitopenia, leucopenia, aumento da creatinina sérica e das enzimas hepáticas séricas, anormalidades hematológicas e reações de hipersensibilidade. Para contrariar estes efeitos adversos, é adicionado ao tratamento o ácido folínico.⁹⁴ O cotrimoxazol (combinação trimetoprim-sulfametoxazol) também tem sido utilizado, apresentando o mesmo modo de ação (antimetabolitos). Além destes, têm sido usados na quimioterapia da toxoplasmose outros fármacos com modos de ação diferentes, como por exemplo a clindamicina, a espiramicina e a atovaquona.

Os fármacos utilizados recorrentemente na quimioterapia da toxoplasmose podem ser classificados de acordo com os processos biológicos do parasita que afetam:⁹⁵

- **Metabolismo do folato:** Síntese de folatos/dihidrofolato redutase (pirimetamina/sulfadiazina e sulfametoxazol/trimetoprim);
- **Atividades associadas ao apicoplasto:** Síntese proteica (clindamicina e espiramicina);
- **Ácido folínico;**
- **Cadeia de transporte de eletrões:** Atovaquona.

2.1.1 Pirimetamina

O tratamento atual da toxoplasmose envolve fármacos que impedem a conversão do ácido dihidrofólico em ácido tetrahidrofólico pelo metabolismo do parasita. Estes fármacos inibem enzimas que intervêm nas etapas de síntese do processo metabólico. Uma destas enzimas é a dihidrofolato redutase (DHFR) e o inibidor da DHFR mais utilizado é a pirimetamina, (5-(4-clorofenil)-6-etil-2,4-pirimidinodiamina), cuja estrutura está representada na Figura 2-1.⁹⁶ A pirimetamina é geralmente usada em combinação com uma sulfonamida inibidora da dihidropteroato sintase (DHPS).^{96,97} Esta combinação sinérgica promove eficazmente a inibição da síntese de ácido fólico, atuando em dois passos sequenciais da sua via biossintética.⁹⁸ Atualmente os antifolatos são o grupo de fármacos mais utilizado no bloqueio da síntese de ADN, promovendo a morte de *Toxoplasma gondii*. Estas moléculas são particularmente ativas contra os taquizoítos na fase aguda, uma vez que as necessidades de ácido fólico se encontram aumentadas nesta fase. Por outro lado, esta combinação não tem efeito sobre os bradizoítos encistados, pelo que não erradica a infeção na sua totalidade,⁹⁹ revelando ineficácia quando a infeção ainda se encontra numa fase subclínica.⁴⁰ Assim, apesar de os antifolatos constituírem a quimioterapia clássica contra toxoplasmose, a administração destes fármacos não previne falhas terapêuticas e recidivas.⁹⁹

Após administração oral, a semivida plasmática da pirimetamina é de cerca de 4 dias. É parcialmente metabolizada no fígado, e excretada na urina. Segundo a OMS, este fármaco pode ser utilizado num conjunto de situações associadas à toxoplasmose. Geralmente o seu uso não é recomendado durante a gravidez, embora seja por vezes utilizada em mulheres grávidas, após o primeiro trimestre de gravidez, quando há risco de transmissão congénita, bem como em recém-nascidos infetados, bebés e crianças.¹⁰⁰ Os adultos com coriorretinite e os doentes com toxoplasmose ativa que são imunodeficientes também podem ser tratados com pirimetamina.¹⁰¹

A toxicidade inerente à pirimetamina é atribuída a uma afinidade similar para a DHFR do parasita e do humano, podendo causar mielossupressão, com maior ênfase ao nível da neutropenia.⁹³ Os riscos são agravados quando é feita a combinação da pirimetamina com um inibidor da DHPS (dihidropteroato sintase), dado que esta classe farmacológica pode causar reações alérgicas.⁹⁶ Também é comum surgirem reações cutâneas graves, teratogenicidade e alterações no metabolismo da bilirrubina.¹⁰² A supressão da medula óssea derivada da pirimetamina é reversível e geralmente a

recuperação ocorre logo após a interrupção ou redução da terapia. A adição de ácido folínico, também denominado por leucovorina, uma forma reduzida de ácido fólico que não é convertida em tetrahidrofolato, suplanta a inibição da DHFR humana pela pirimetamina.¹⁰³

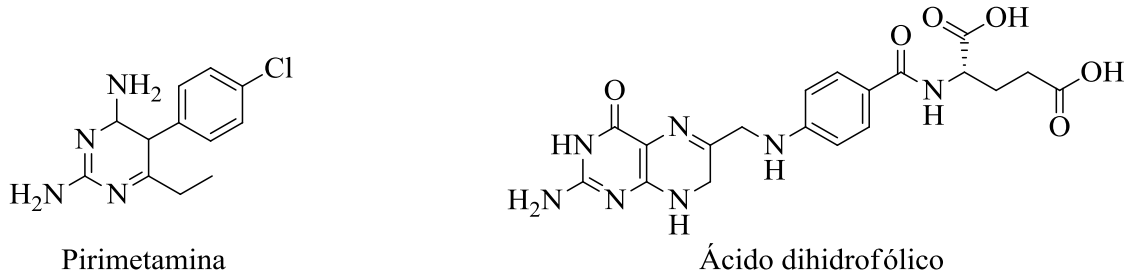


Figura 2-1: Representação das estruturas da pirimetamina e do ácido dihidrofólico.

2.1.2 Sulfadiazina

Sabin e Warren demonstraram o efeito antibacteriano das sulfonamidas em 1942. Estudos posteriores, conduzidos por Eyles e Coleman, demonstraram a atividade da pirimetamina contra *T. gondii* e também a sinergia entre a sulfadiazina, uma sulfonamida, e a pirimetamina, no tratamento.¹⁰⁴ A enzima dihidropteroato sintase (DHPS) é responsável pela fusão do pirofosfato-6-hidroximetil-7,8-di-hidropterina (derivado do GTP) com o ácido p-aminobenzóico para formar o dihidropteroato.¹⁰⁵ As sulfonamidas são um grupo de agentes antimicrobianos sintéticos que atuam como análogos do ácido p-aminobenzóico (PABA), antagonizando competitivamente a DHPS. Atualmente, as sulfonamidas são usadas em combinação com outros agentes antimicrobianos.¹⁰⁶

A sulfadiazina, cuja estrutura se encontra representada na Figura 2-2, é absorvida pelo trato gastrointestinal e distribuída no organismo, apresentando uma semivida sérica de 10 a 12 horas. Após a acetilação parcial no fígado, é excretada na urina.¹⁰¹ A pirimetamina e sulfadiazina (Figura 2-2) são usadas em combinação para tratamento da toxoplasmose congênita, sendo também utilizadas como profilaxia em alguns países.¹⁰⁷ A administração de sulfonamidas durante a gravidez pode induzir reações graves de hipersensibilidade na mãe e conduzir a reações adversas no feto, uma vez que este agente é responsável por deslocar a bilirrubina da ligação às proteínas, promovendo

o aparecimento de icterícia nos recém-nascidos.¹⁰¹ A combinação de pirimetamina / sulfadiazina é o tratamento padrão para a encefalite resultante da toxoplasmose.⁹⁸

Na toxoplasmose congênita, a sulfadiazina pode ser usada em monoterapia, durante o primeiro trimestre, e depois da fase de desenvolvimento fetal pode ser administrada em combinação com a pirimetamina, se o benefício da utilização da terapêutica for superior ao risco para o feto.¹⁰⁸ A pirimetamina e a sulfadiazina, utilizadas no período pré-natal, foram também usadas em terapia pós-natal.¹⁰⁹ O tratamento pós-natal da toxoplasmose congênita com estes fármacos manteve-se durante um longo período, acabando por ser substituído pela sulfadoxina, já que este fármaco tem como principal vantagem um tempo de semivida mais longo, facilitando o esquema terapêutico.¹¹⁰

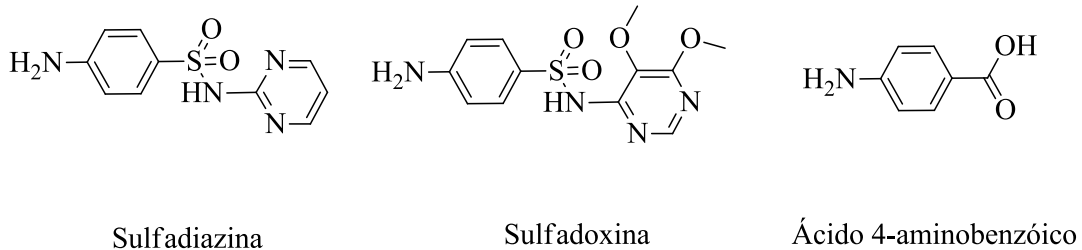


Figura 2-2: Representação das estruturas da sulfadiazina, da sulfadoxina e do ácido 4-aminobenzóico.

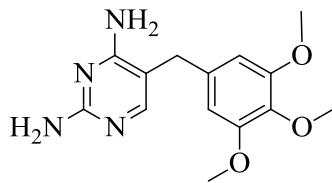
2.1.3 Associação de sulfametoxazol e trimetoprim

O trimetoprim (Figura 2-3) inibe a dihidrofolato redutase (DHFR) bacteriana, impedindo a conversão do ácido dihidrofólico em ácido tetraidrofólico. A inibição da enzima pelo trimetoprim impede as bactérias de sintetizar os nucleótidos necessários para a replicação do ADN.¹¹¹ O sulfametoxazol (Figura 2-3) é um fármaco da classe das sulfonamidas que atua por inibição do acoplamento da pteridina e do ácido p-aminobenzóico (PABA), com formação de ácido dihidropteróico, um processo catalisado pela enzima dihidropteroato sintase. O sulfametoxazol compete com o PABA na ligação a esta enzima, envolvida a montante na via de síntese de nucleótidos.

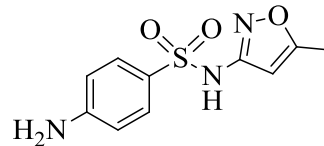
O trimetoprim e o sulfametoxazol são comumente usados em combinação devido aos seus efeitos sinérgicos. Esta combinação é usada em doentes imunocomprometidos, por exemplo na sequência de infecção por HIV. A presença de um transportador de folato exógeno, que possibilita o transporte de blocos intermédios para o interior do parasita,

traduz-se na redução da eficiência dos fármacos antifolato, uma vez que alguns passos desta via de síntese deixam de ser necessários.¹¹²

A associação trimetoprim/sulfametoxazol é categorizada em relação ao seu uso na gravidez como sendo C e é excretada no leite materno. Geralmente, o trimetoprim e o sulfametoxazol devem ser evitados pelas mulheres quando estas estiverem a amamentar bebês prematuros, com icterícia ou que tenham deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase.⁵ Existem evidências, embora limitadas, de que esta combinação possa surtir efeito na prevenção da toxoplasmose em casos de doentes que sofreram transplante de órgãos.¹¹³ A interferência no metabolismo do ácido fólico pode causar uma depressão da hematopoiese, conduzindo a um conjunto de efeitos adversos, como a anemia, a neutropenia e a trombocitopenia. Também foram relatados casos de hipercaliemia, hipoglicemia e hipersensibilidade.¹¹⁴



Trimetoprim



Sulfametoxazol

Figura 2-3: Representação das estruturas do trimetoprim e do sulfametoxazol.

2.1.4 Clindamicina

A clindamicina, cuja estrutura se encontra representada na Figura 2-4, é um antibiótico pertencente à família das lincosamidas.¹¹⁵ Foi verificada a sua eficácia no tratamento de toxoplasmose e foi proposto que a sua ação molecular induz a inibição da subunidade ribossômica 50S presente no apicoplasto de *T. gondii*, impedindo a síntese de proteínas essenciais ao parasita.⁹³ Este antibiótico também atua quando os taquizoítos estão fora da célula hospedeira, mais precisamente, no momento de reinfeção das células adjacentes. Desta forma, os mecanismos de fixação e entrada de *T. gondii* nas células nucleadas são inibidos, existindo uma redução da infecciosidade do organismo.¹¹⁶

A clindamicina pode ser usada em doentes que não tolerem sulfonamidas e que, por esse motivo, não respondam à terapêutica de primeira linha, composta por

pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico.^{117,118} Embora a clindamicina seja uma opção no tratamento da toxoplasmose aguda, a sua ação na infecção crônica não está totalmente esclarecida.⁹⁷ A clindamicina e a dexametasona demonstraram eficácia no tratamento da retinocoroidite, devido à boa penetração intracelular dos fármacos nas células infetadas pelo *T. gondii*.¹¹⁹ Verificou-se que, apesar das propriedades farmacocinéticas indicarem uma má distribuição da clindamicina no sistema nervoso central, esta apresenta efeitos terapêuticos no local. O mecanismo de ação da clindamicina no sistema nervoso central não é conhecido.¹²⁰ O conhecimento sobre o uso de clindamicina em mulheres grávidas é limitado, sendo classificada como B.⁵ Os efeitos colaterais geralmente associados ao uso deste antibiótico são erupções cutâneas, hepatotoxicidade e diarreia.¹¹⁵

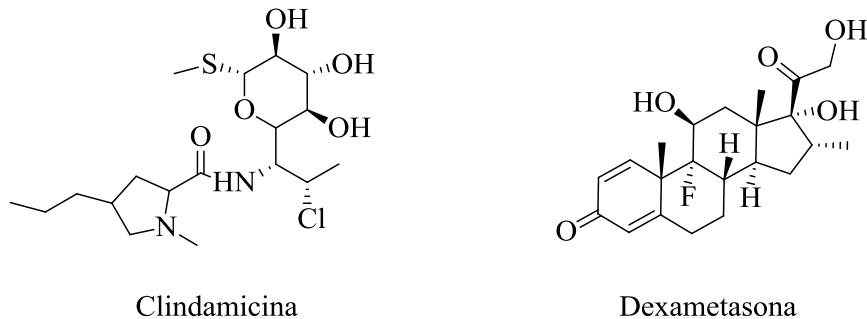


Figura 2-4: Representação das estruturas da clindamicina e da dexametasona.

2.1.5 Espiramicina

A espiramicina (Figura 2-5) é um antibiótico de origem natural produzido por *Streptomyces ambofaciens*. Este agente antimicrobiano pertence à classe dos macrólidos e a sua atividade contra *Toxoplasma gondii* foi confirmada.¹²¹ A espiramicina inclui um macrociclo constituído por 16 membros. O composto liga-se às subunidades ribossômicas 50S das bactérias, inibindo desta forma a translocação.¹²¹

O uso da espiramicina em toxoplasmose tornou-se especialmente importante com a descoberta de que este fármaco diminui a frequência da transmissão vertical. A proteção conferida pelo antibiótico foi mais eficaz em mulheres infetadas durante o primeiro trimestre de gestação, atingindo uma redução da transmissão da infecção em 60%.⁴⁶ Após as devidas avaliações, se a infecção fetal não ocorreu o tratamento com espiramicina é continuado até ao parto, uma vez que não existem evidências de que este seja teratogénico.^{46,113} Como a espiramicina não atravessa a placenta, não deve ser usada para

necessidade de reduzir a dose ou de alterar terapias eficazes.¹²⁵ Estudos demonstraram que *T. gondii* tem acesso ao folato da célula hospedeira, quando privado de o sintetizar. Sabe-se que o transportador humano de folato é mais específico, captando folatos reduzidos, enquanto que o transportador de *T. gondii* capta todos os metabolitos de folatos. A leucovorina permite que a terapêutica com antifolatos contra *T. gondii* não seja totalmente antagonizada, dado que é uma forma seletiva para o transportador humano.¹¹² A utilização do ácido folínico pode acarretar efeitos secundários, como urticária, dificuldade em respirar, inchaço do rosto, lábios, língua ou garganta.¹²⁶

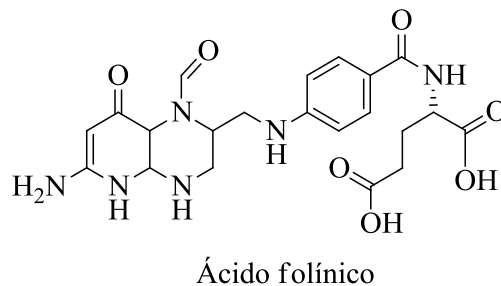


Figura 2-6: Representação da estrutura do ácido folínico.

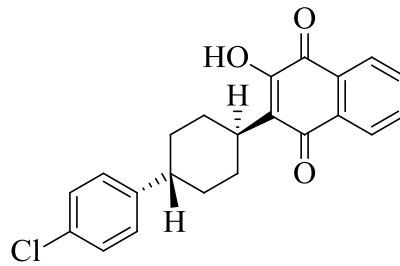
2.1.7 Atovaquona

A atovaquona é uma hidroxi-1,4-naftoquinona (Figura 2-7) utilizada no tratamento da toxoplasmose em doentes que não toleram a terapêutica clássica.¹²⁷ Este fármaco está aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o combate a doenças oportunistas parasitárias, excluindo a toxoplasmose congénita, sendo particularmente indicado em situações de toxoplasmose ocular e no SNC.^{128,129} O seu mecanismo de ação envolve a inibição seletiva da cadeia transportadora de eletrões, nas mitocôndrias de protozoários.¹³⁰ O citocromo bc1 é uma enzima ligada à membrana da cadeia transportadora de eletrões, localizada na membrana da mitocôndria. Este citocromo reduz o citocromo c e gera um gradiente eletroquímico, transferindo protões para o espaço intermembranar. O citocromo bc1 tem dois sítios ativos, o domínio Qo (que oxida o ubiquinol a ubiquinona) e o domínio Qi (que reduz a ubiquinona a ubiquinol). A atovaquona liga-se ao domínio Qo, inibindo o processo eletroquímico associado à respiração mitocondrial.¹³¹ A atovaquona apresenta como características, uma semivida que varia entre 1,5 e 3 dias, sendo maioritariamente excretada nas fezes (94%) sem que seja metabolizada.¹³² Os alimentos aumentam a biodisponibilidade da atovaquona, que

pode ser administrada com os fármacos utilizados na terapia tripla, atuando sinergicamente com estes.¹²⁹

A atovaquona é considerada uma alternativa bastante eficaz, atuando contra taquizoítos e também contra bradizoítos encistados de *T. gondii* e segura, já que muito poucos efeitos secundários foram reportados, tanto em indivíduos saudáveis como em doentes imunocomprometidos. A eficácia desta molécula nas diversas formas infecciosas do patógeno e a baixa incidência de efeitos adversos tornam a atovaquona uma alternativa aliciente, face aos tratamentos atuais, para a retinite por toxoplasma.¹³⁰

No entanto foram relatadas falhas no tratamento com este fármaco, em doentes que foram sujeitos a transplantes de células hematopoiéticas ou em doentes com SIDA. Estudos posteriores demonstraram que a existência de mutações no domínio Qo do citocromo bc1 está relacionada com o surgimento de resistências à atovaquona.¹³¹



Atovaquona

Figura 2-7: Representação da estrutura da atovaquona.

2.2 Avanços na quimioterapia contra *T. gondii*

Nesta secção destacamos os estudos realizados, ou em curso, sobre moléculas com potencial para o tratamento da toxoplasmose. As moléculas apresentadas possuem atividade biológica comprovada. Algumas estão aprovadas para o tratamento de outras doenças, outras encontram-se em desenvolvimento, sendo candidatos a fármacos.

Para que a eliminação dos parasitas Apicomplexa seja realizada com sucesso, os agentes terapêuticos devem transpor as células do hospedeiro, o vacúolo parasitóforo e também as membranas e paredes do cisto. Todas estas barreiras representam dificuldades para que o fármaco atinja o alvo onde deve exercer o seu efeito terapêutico.¹³³ Acresce que os fármacos geralmente usados para combater a toxoplasmose são mal tolerados e

agem principalmente contra taquizoítos, não erradicando formas encistadas nem bradizoítos.^{134,135} O facto de os cistos teciduais existentes no cérebro estarem protegidos pela barreira hematoencefálica torna o tratamento menos eficaz. Além disso, se os doentes se tornarem imunossuprimidos os cistos teciduais podem romper-se, levando à libertação de bradizoítos, que irão multiplicar-se em taquizoítos. Esta forma infecciosa origina encefalite focal ou difusa.¹³⁵

Nos últimos anos, a comunidade científica tem intensificado esforços em prol de colmatar as lacunas existentes na terapêutica da toxoplasmose, a fim de atingir o controlo da doença, o que não foi ainda conseguido. A patogénese de *T. gondii* apresenta-se como um desafio para o desenvolvimento de uma terapia medicamentosa eficaz já que, ao contrário de outros parasitas Apicomplexa, este coccídeo atravessa a barreira hematoencefálica, estabelecendo no cérebro uma infeção persistente causada por bradizoítos, forma esta que se tem demonstrado resistente aos medicamentos.

O desenvolvimento de novos fármacos para tratamento da toxoplasmose representa desafios importantes: os novos fármacos devem alcançar concentrações terapêuticas sistémicas no cérebro e olhos (órgãos maioritariamente afetados pela doença) e exibir atividade contra as formas de taquizoíto e de bradizoíto. Deve também apresentar baixa toxicidade e eficácia elevada, reduzindo a duração do tratamento e garantindo a segurança na gravidez. Adicionalmente, as novas formulações devem ser baratas e fáceis de utilizar, favorecendo a adesão à terapêutica e a sua aplicação, sobretudo nas áreas pobres do mundo.⁹³

As moléculas investigadas recorrentemente no âmbito da quimioterapia da toxoplasmose podem ser classificadas quanto à sua atividade, nomeadamente aos alvos e aos processos biológicos que inibem:⁹⁵

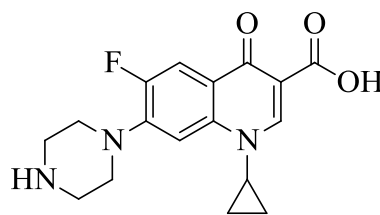
- **Atividades associadas ao apicoplasto:** DNA girase (ciprofloxacina) e ácidos gordos (triclosan);
- **Enzimas dependentes de pirofosfato:** Bifosfonatos;
- **Expressão do gene:** Apicidina;
- **Tubulina:** Dinitroanilinas;
- **Via do chiquimato:** Glifosato;

- **Lactato desidrogenase:** Gossipol;
- **Biossíntese de poliamina:** DMF e DFMO.

2.2.1 Ciprofloxacina

A ciprofloxacina, representada na Figura 2-8, pertence à classe das fluoroquinolonas, cuja ação se baseia na inibição da DNA girase e da DNA topoisomerase IV, comprometendo a replicação do protozoário.⁹³ Fichera e Ross mostraram que o tratamento de *T. gondii* com ciprofloxacina conduz à perda progressiva do ADN do apicoplasto. Embora este antibiótico não afete o primeiro ciclo de proliferação do parasita nas células hospedeiras, verificou-se que no segundo ciclo de proliferação, em novas células hospedeiras, os parasitas que haviam sido tratados com ciprofloxacina sofreram uma redução na sua taxa de duplicação.¹³⁶

A ciprofloxacina é normalmente bem tolerada, apresentando baixa incidência de efeitos colaterais, que afetam maioritariamente ao nível psicótico, como no caso das febres. As tendinites ou a rotura de tendões estão geralmente associadas a este antibiótico específico e não à classe em que se insere.¹³⁷ Estudos indicam que a exposição a fluoroquinolonas durante a gestação não promove malformações. No entanto, estas conclusões não são suficientes para excluir a possibilidade de risco teratogénico associada a esta classe.¹³⁸ A ciprofloxacina é excretada no leite materno, pelo que a utilização destes medicamentos em gestantes ou durante a amamentação deve ser ponderada cautelosamente.¹³⁹



Ciprofloxacina

Figura 2-8: Representação da estrutura da ciprofloxacina.

2.2.2 Triclosan

O triclosan (2,4,4-tricloro-2-hidroxi-difenil éter), representado na Figura 2-9, é um agente antimicrobiano de amplo espectro que, devido ao seu perfil de segurança favorável, foi incorporado num conjunto de produtos de higiene pessoal. As ocorrências de irritação ou sensibilidade da pele a este fármaco em seres humanos são raras, não existindo evidências de potencial carcinogénico, mutagénico ou teratogénico.¹⁴⁰

Esta molécula constitui uma alternativa à terapia padrão para o tratamento da toxoplasmose, uma vez que tem a capacidade de bloquear a síntese lipídica por inibição da enzima enoil-ACP-redutase, também denominada por Fab I.¹⁴¹ A Fab I é uma enzima envolvida na síntese de ácidos gordos.¹⁴² A biossíntese de ácidos gordos é iniciada pela condensação de acetil-coenzima A com uma cadeia de ácido gordo em crescimento. Posteriormente, em *T. gondii*, a enzima enoil-ACP-redutase é responsável pelo alongamento da cadeia do ácido gordo, através da redução de *trans*-2-enoil-ACP para acil-ACP, mediada por NADH.¹⁴³

Alguns estudos demonstraram que a eficácia do triclosan aumenta quando este está envolvido numa formulação lipossómica, possibilitando o uso de uma dose menor. Esta formulação conduziu à desintegração do plasma e das membranas nucleares do parasita, bem como à destruição das suas estruturas internas.¹⁴⁴ Foi também observado que a conjugação de triclosan com octa-arginina conduz a uma diminuição da contagem de parasitas no indivíduo, em comparação com a utilização de triclosan sozinho.¹⁴⁵

Embora potente, o triclosan apresenta propriedades ADME fracas, sendo especialmente relevante a fraca solubilidade em água. Com o intuito de mitigar estas fragilidades, sintetizaram-se moléculas com modificações no anel B da estrutura do triclosan, já que estudos prévios de relação estrutura-atividade indicaram que a funcionalização deste anel não provoca alterações na eficácia.¹⁴³ As mudanças estruturais consistiram na adição de anéis de piperazina, furano ou tiofeno, introduzidos para ocupar o local onde ocorre a inserção de ácidos gordos pela enoil-ACP-redutase. Esta zona é revestida por resíduos de aminoácidos relativamente bem conservados, em particular o resíduo de aminoácido Asn130 que desempenha um papel importante na interação com os ligandos. Verificou-se que os compostos que formam pontes de hidrogénio com Asn130, exibem atividade inibidora. Os compostos 14b, 5c e 18, representados na Figura 2-9, correspondem a otimizações estruturais realizadas a partir do triclosan. Estes

compostos demonstraram toxicidade muito baixa para os fibroblastos do ser humano, em contraste com a elevada atividade no parasita.¹⁴³

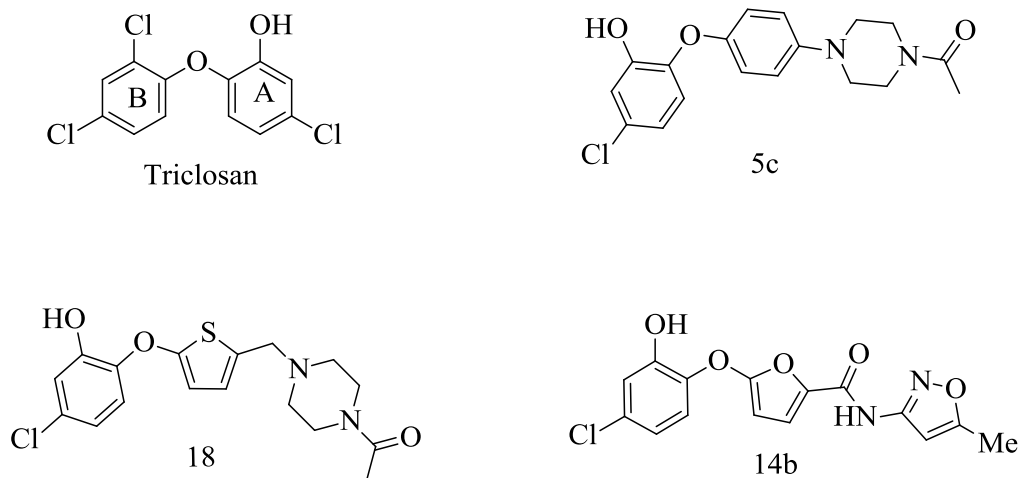


Figura 2-9: Representação da estrutura do triclosan e dos seus análogos otimizados, 5c, 18 e 14b.

2.2.3 Análogos fosfônicos

A fosfofrutocinase é uma enzima presente em *Toxoplasma gondii* que é responsável pela fosforilação da frutose-6-fosfato, com formação de frutose-1,6-bifosfato. Esta cinase assume importância na regulação da glicólise, sendo que o parasita requer PPi como doador do grupo fosfato, em vez de ATP, que é requerido pela célula hospedeira. Assim, a inibição da PPi-PFK priva o *T. gondii* da sua principal fonte de energia. Uma vez que os mamíferos não a possuem, esta enzima é um alvo ideal para o desenho de agentes quimioterápicos.¹⁴⁶

Os bifosfonatos (análogos de PPi), representados na Figura 2-10, são inibidores da reabsorção óssea, sendo usados clinicamente na prevenção da osteoporose e no tratamento de doenças ósseas, incluindo a doença de Paget, a hipercalcemia e as metástases ósseas. A ação seletiva no osso é baseada na ligação da porção bifosfonato ao mineral ósseo.¹⁴⁷ Relativamente ao seu uso na toxoplasmose, esta classe atua não só pela inibição da produção de energia, como também inibe a via de produção de isoprenóides, essenciais à síntese de ubiquinonas e ao funcionamento de enzimas. A produção de isoprenóides ocorre no apicoplasto, e é iniciada com o acoplamento de difosfato de isopentilo com difosfato de dimetilalilo, mediado pela enzima farnesil pirofosfato sintase

(FPPS). A FPPS é inibida pelos bifosfonatos, bloqueando a produção de isoprenóides. No entanto, estudos demonstraram que esta enzima não é essencial para *T. gondii*, pois este parasita consegue obter os substratos intermediários para a síntese de isoprenóides a partir do hospedeiro. A combinação de estatinas com bifosfonatos produz um efeito sinérgico ao inibir a via de produção de isoprenóides, tanto no parasita como na célula hospedeira.^{148,149} É de notar que os macrófagos e os osteoclastos são particularmente suscetíveis a estes compostos, sendo a concentração de bifosfonatos mais elevada nos órgãos do que no plasma.¹⁵⁰

A seletividade dos bifosfonatos é alcançada através de ajustes estruturais na cadeia lateral. Foi demonstrado por alguns grupos de investigação que os inibidores ativos da enzima pertencem ao grupo dos ácidos aminobifosfónicos, uma classe que mimetiza o polifosfato utilizado para fornecer energia à enzima PFK.^{151,152} Outros autores, concluíram que o composto com a maior atividade contra o crescimento de *T. gondii* incorpora uma extensa cadeia alifática, favorecendo a sua internalização para o meio intracelular, onde o parasita reside e se replica. Estes resultados foram pioneiros, demonstrando que os bifosfonatos de alquilo poderiam fornecer proteção contra a morte devida à infeção por *T. gondii*. O alendronato conduziu a apenas 55% de proteção do organismo, enquanto que a utilização de compostos do quimiotipo 22 (Figura 2-10) garantiram uma proteção de 80%.¹⁵³

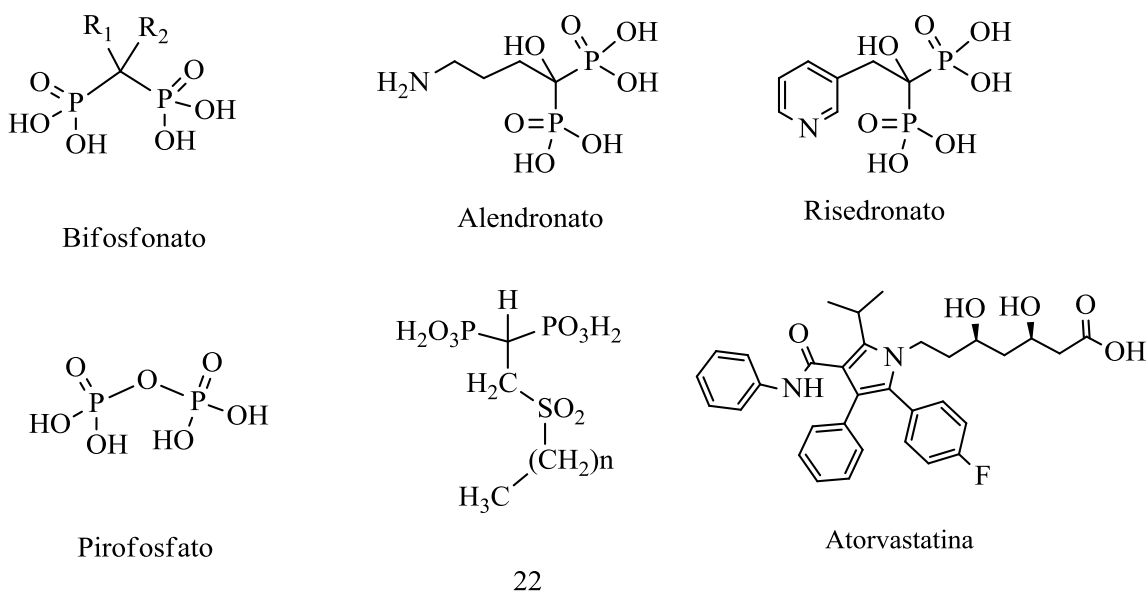


Figura 2-10: Representação das estruturas do bifosfonato, do pirofosfato, do alendronato, do risedronato, dos compostos análogos otimizados do tipo 22 e da atorvastatina.

2.2.4 Apicidina

A apicidina (N-O-metil-L-triptofanil-L-isoleucinil-D-pipecolinil-L-2-amino-8-oxodecanoilo), representada na Figura 2-11, é um tetrapéptido cíclico isolado do fungo endofítico, *Fusarium pallidoroseum*.¹⁵⁴ Esta molécula representa um agente antiprotozoário potente e de amplo espectro de ação, atuando num conjunto de parasitas Apicomplexa, com atividade em concentrações na gama nanomolar.¹⁵⁵ O fármaco pode ser administrado por via oral ou parentérica,¹⁵⁶ estando a ação farmacológica associada à inibição reversível da histona desacetilase (HDAC).¹⁵⁵ As HDACs são uma família de isoenzimas nucleares que regulam a transcrição genética através de um processo de acetilação/desacetilação do grupo ε-amino de resíduos de lisina em histonas. O bloqueio do processo de desacetilação causa hiperacetilação das histonas, o que por sua vez interfere na regulação transcricional e, conseqüentemente, na proliferação celular, provocando a morte celular do parasita.^{156,157} Na molécula de apicidina, o ácido 2-amino-8-oxo-decanóico (grupo AODA) mimetiza os resíduos de lisina acetilados das histonas, resultando numa inibição reversível de HDAC.¹⁵⁸

Apesar de todas as vantagens inerentes à apicidina, a falta de seletividade parasitária desta molécula constitui um aspeto limitante que carece de otimização.¹⁵⁹ Com o intuito de se otimizar a apicidina, foram conduzidos estudos que detalharam com mais precisão a funcionalidade do grupo indol e o seu papel na ligação à enzima HDAC. O grupo cetona na posição C-8 e a porção de triptofano também se revelaram essenciais para a atividade antiparasitária da molécula contra *T. gondii*.¹⁵⁴

Com base nesta informação, conjugaram-se os esforços para a síntese de uma biblioteca de derivados de apicidina com propriedades melhoradas, da qual foram selecionadas duas quinolonas (compostos 5 e 6; Figura 2-11) com afinidade elevada para a HDAC do parasita. Embora a atividade destes compostos seja ligeiramente inferior à demonstrada pela apicidina, ambas as quinolonas mostraram uma afinidade significativamente menor para HDAC aviária em relação à apicidina, permitindo um aumento médio de 67 e 25 vezes na seletividade para a HDAC do parasita com a utilização das quinolonas 5 e 6, respetivamente.¹⁶⁰

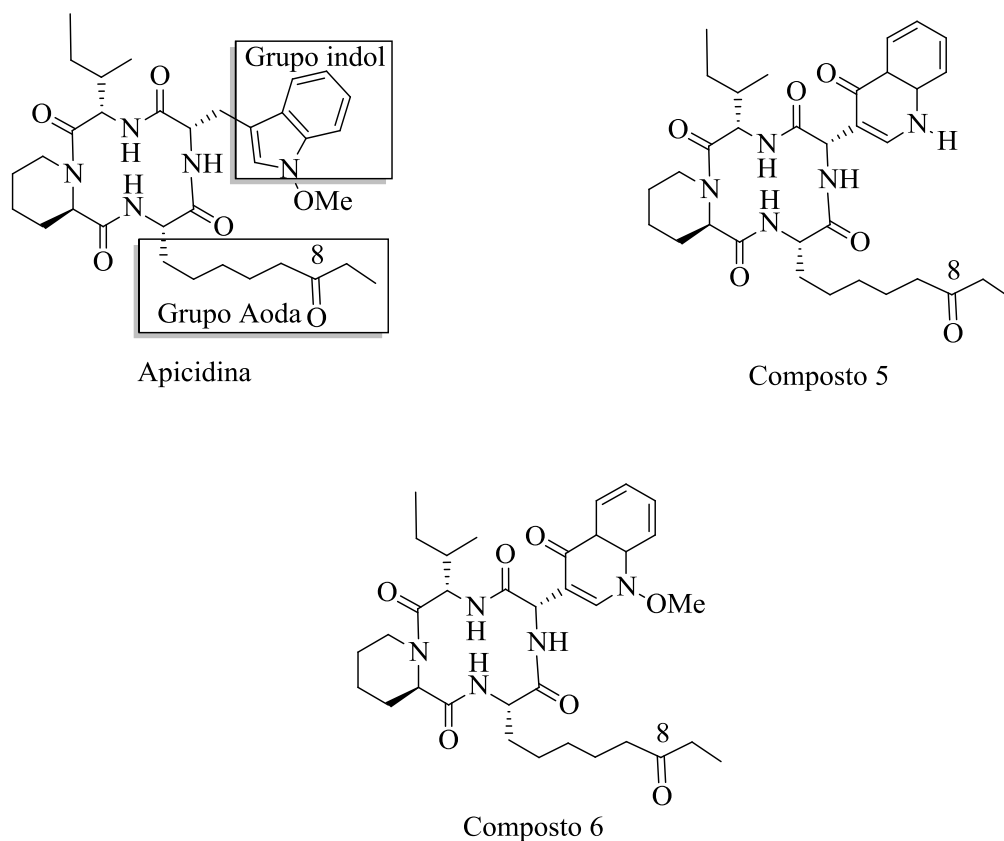


Figura 2-11: Representação das estruturas do grupo AODA e dos seus derivados, compostos 5 e 6.

2.2.5 Dinitroanilinas

Os microtúbulos são componentes essenciais nas células eucarióticas, formando diversas estruturas que coordenam o movimento celular, o transporte de vesículas, a polaridade celular e a mitose. Um microtúbulo típico é um polímero cilíndrico formado por 13 protofilamentos longitudinais. Cada protofilamento é construído pela ligação cabeça-cauda dos heterodímeros de α - β -tubulina. Dados computacionais indicam que as dinitroanilinas se ligam às subunidades de α -tubulina do protozoário¹⁶¹

As dinitroanilinas (Figura 2-12) são uma classe de moléculas que inclui fármacos importantes como a orizalina, a trifluralina e a etalfluralina.¹⁶¹ Inicialmente as dinitroanilinas foram utilizadas como herbicidas, devido à sua capacidade de atuar como inibidoras da formação dos microtúbulos vegetais.¹⁶² Hoje sabe-se que estes agentes também atuam nos microtúbulos de protozoários, não apresentando a mesma eficácia nas células de vertebrados.¹⁶¹ Após a adição do herbicida, os parasitas permanecem

metabolicamente ativos por um período de tempo considerável mas perdem a capacidade de se dividir, devido a perturbações na formação do corpo fusiforme durante a merogonia. Além de perturbarem a formação do fuso intracelular, estudos demonstraram que as dinitroanilinas também atuam noutras componentes do citoesqueleto. Nos parasitas tratados com orizalina verificou-se a existência de grandes fragmentos da membrana interna no seu citoplasma, enquanto que nos parasitas tratados com etalfluralina se observou a presença de distensões do envelope nuclear e do retículo endoplasmático.¹⁶²

A incidência de mutações na alfa-tubulina em parasitas *T. gondii* promove o desenvolvimento de resistências às dinitroanilinas. As mutações referenciadas como G142S ou F52Y suprimiram os defeitos dos microtúbulos originados pelo fármaco, permitindo assim a replicação exacerbada do parasita.¹³¹

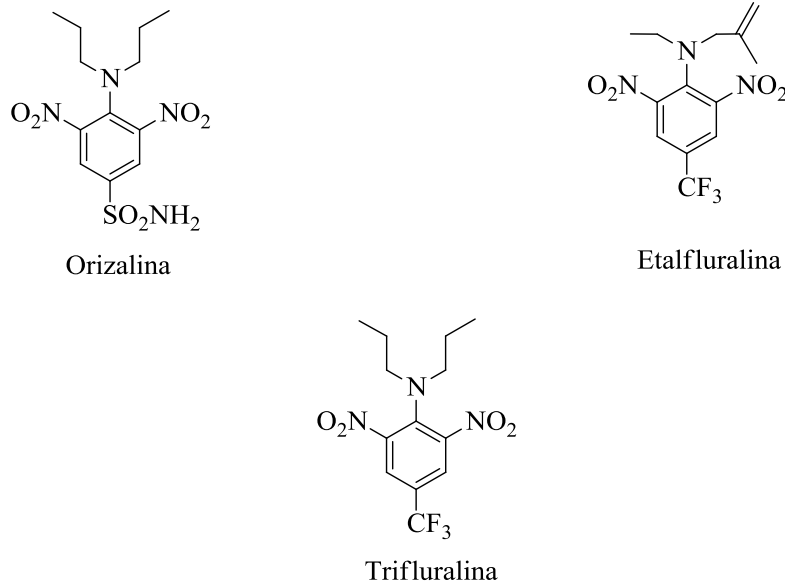


Figura 2-12: Representação das estruturas da orizalina, etalfluralina e trifluralina.

2.2.6 Glifosato

Os aminoácidos aromáticos são sintetizados pela via do chiquimato, localizada no plastídio em plantas e algas.¹⁶³ A biossíntese de aminoácidos aromáticos em plantas e em muitas bactérias depende da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) sintase, a sexta enzima da via do chiquimato.¹⁶⁴ A localização desta via em parasitas ainda não é clara embora alguns estudos apontem para a localização no citosol do parasita e não no apicoplasto.¹⁶³ A obtenção de aminoácidos aromáticos pelos mamíferos ocorre a partir

da dieta, uma vez que os mamíferos não possuem a EPSP sintase.¹⁶³ A descoberta de uma via do chiquimato em *Plasmodium*, *Cryptosporidium* e *Toxoplasma* permitiu explicar a atividade parasitária do glifosato, um herbicida comum que bloqueia a atividade desta enzima.¹⁶³ O herbicida glifosato, N-fosfometilglicina (Figura 2-13), começou por ser utilizado no combate às ervas daninhas.¹⁶⁵ Hoje sabe-se que também inibe o crescimento de parasitas, atuando por inibição da EPSP sintase. Esta enzima interage com dois substratos, o chiquimato 3-fosfato e o fosfoenol piruvato. A enzima, com dois domínios, fecha-se aquando da ligação ao chiquimato 3-fosfato, formando assim o segundo sítio ativo na fenda interdominal. O glifosato ocupa o local de ligação do segundo substrato da EPSP sintase, o fosfoenol piruvato, mimetizando um estado intermediário do complexo ternário da enzima.¹⁶⁴

De acordo com a literatura, os herbicidas derivados de glifosato provocam danos no ADN, alterações na atividade mitocondrial e na integridade da membrana celular humana.¹⁶⁶ Os mamíferos e humanos podem ser expostos a resíduos de herbicidas, por práticas agrícolas ou através da cadeia alimentar. Além do impacto direto na saúde humana, o glifosato também é responsável pela contaminação de rios. Embora seja frequente os utilizadores destes herbicidas relatarem problemas de gravidez, o mecanismo de ação do glifosato em mamíferos ainda é questionado. Também foi recentemente demonstrado que interrompe o ciclo celular animal em ovos de ouriço e até mesmo a expressão pós-transcricional da proteína reguladora esteroideogénica aguda (StAR) em células de *Leydig* testiculares de murganhos.¹⁶⁷ Um estudo realizado em 2013 provou que o glifosato exerce efeitos proliferativos no cancro da mama dependente de estrogénio ao possuir um efeito aditivo à genisteína na ativação de ERE (*Estrogen Response Elements*) e no crescimento celular. Além disso é responsável pela alteração dos recetores de estrogénio, aumentando a taxa de expressão de ER α (*Alpha Estrogen Receptor*) e ER β (*Beta Estrogen Receptor*).¹⁶⁸

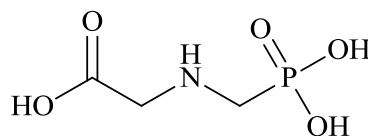


Figura 2-13: Representação da estrutura do glifosato.

2.2.7 Gossipol

O gossipol (Figura 2-14) é um composto polifenólico oriundo do algodoeiro (género *Gossypium*, família *Malvaceae*). A presença de seis grupos hidroxilo fenólicos e de dois grupos aldeído torna o gossipol quimicamente reativo, em ambientes químicos diversos.¹⁶⁹ Esta molécula exerce diferentes atividades biológicas, incidindo a sua ação versátil em tumores resistentes, HIV, malária e doenças de pele hiperproliferantes.¹⁷⁰

A capacidade de induzir a paragem do ciclo celular na fase G0/G1, inibindo a replicação do ADN e conduzindo a apoptose, é uma das vantagens do gossipol. Também é conhecido por inibir enzimas de sinalização celular, comprometendo o crescimento celular.¹⁷¹ Posteriormente descobriu-se que o gossipol também atua por inibição da enzima lactato desidrogenase, responsável pela glicólise em *T. gondii* e *P. falciparum*. A infeção provocada por *T. gondii* envolve a conversão entre a fase aguda, caracterizada pela replicação rápida dos taquizoítos e dos bradizoítos e a fase crónica, em que se dividem lentamente. Este coccídeo expressa dois genes distintos da enzima lactato desidrogenase: a LDH1, que surge na fase aguda, e a LDH2, que é expressa preferencialmente na fase crónica. A enzima LDH catalisa uma etapa enzimática da via glicolítica, o processo responsável pela interconversão piruvato/lactato e que tem como finalidade o fornecimento de energia a *T. gondii*. A supressão da LDH1 compromete a virulência aguda do parasita, enquanto que a supressão da LDH2 afeta a virulência ou a diferenciação do bradizoítos na fase crónica.¹⁷²

O gossipol apresenta ação anti espermatogénica eficaz, que suscitou estudos sobre a sua potencial utilização como contraceptivo masculino. No entanto verificou-se irreversibilidade do efeito anti espermatogénico, tornando o humano estéril, o que provocou o indeferimento desta molécula por parte da OMS.¹⁷³ Os efeitos nas mulheres podem incluir irregularidades no ciclo, rutura luteolítica da gravidez e toxicidade embrionária.¹⁷¹ Este fármaco provoca vários efeitos secundários, nomeadamente a hipocaliemia e a toxicidade gastrointestinal, uma vez que é absorvido no intestino e no estômago.¹⁷⁰ A investigação em torno desta molécula centra-se no seu modo de ação e na elucidação dos mecanismos subjacentes à sua toxicidade para o hospedeiro. O objetivo é a otimização estrutural, melhorando o índice de segurança.¹⁷³

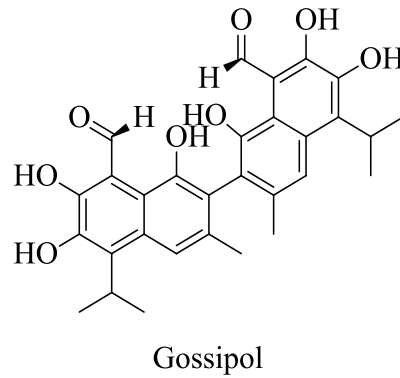


Figura 2-14: Representação da estrutura do gossipol.

2.2.8 DMF e DMFO

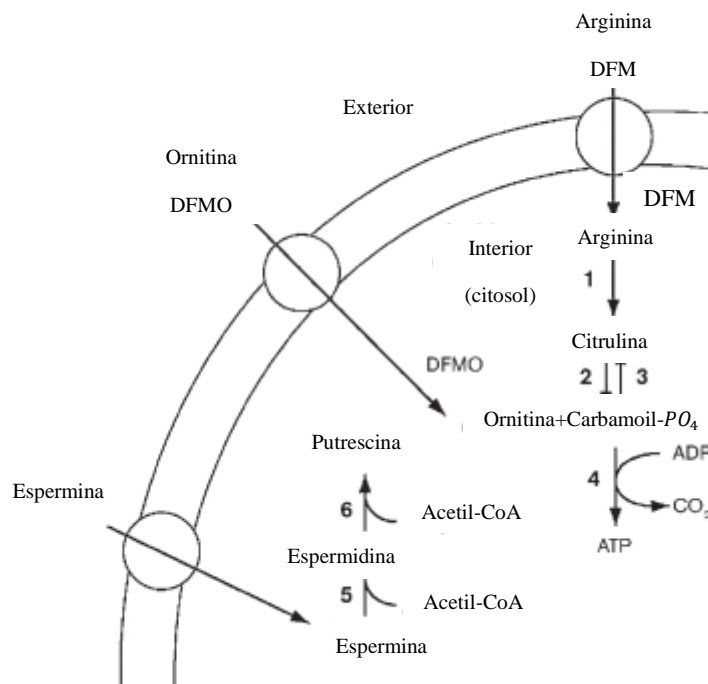


Figura 2-15: Representação do processo de produção de poliaminas pelo *T. gondii*. Adaptado ¹⁷²

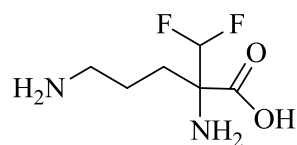
Uma poliamina é um composto constituído por, pelo menos, dois grupos amina (–NH–), com capacidade para protonar e para se ligar ao ADN. Em *T. gondii*, as poliaminas são um grupo de aminoácidos que incluem a putrescina, a espermidina, a espermina e a ornitina. As funções específicas destas poliaminas em *T. gondii* ainda não são claras. Este

coccídeo é auxotrófico para a biossíntese de arginina e para todas as suas poliaminas (Figura 2-15).¹¹²

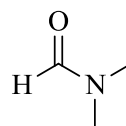
A arginina captada pelo hospedeiro é metabolizada através da via ADH (*Host Derived Arginine*), com o objetivo da obtenção de energia na forma de ATP. Outra função desta via consiste em desviar a arginina do hospedeiro, aminoácido este necessário para a síntese de NO. Como visto anteriormente, o óxido nítrico está envolvido no mecanismo de defesa do hospedeiro.¹⁷⁴ A privação de arginina retarda a taxa de crescimento do parasita e induz a diferenciação de *T. gondii* em formas inativas de cisto, *in vitro*. A incubação de parasitas com dimetilformamida (Figura 2-16), um análogo de arginina, reduz os níveis de arginina em *T. gondii*. O DMF compete com a arginina no transporte para o interior do parasita, através dos transportadores expressos por este.¹¹²

A ornitina é captada do hospedeiro pelo parasita através de um sistema de transporte deste aminoácido. Os parasitas incubados com difluorometilornitina (DMFO; Figura 2-16) apresentam uma redução significativa nos níveis de ornitina devido à competição entre o DMFO e a ornitina para o mesmo local de ligação na superfície do parasita.¹¹² Estudos anteriores indicaram que o inibidor específico irreversível DFMO é apenas eficaz na inibição do crescimento de *T. gondii* quando utilizado em concentrações que são tóxicas para as células hospedeiras.¹⁷⁴

A obtenção de putrescina pelo protozoário pode ser realizada de duas formas. Ou é adquirida por um sistema de transporte de putrescina existente no parasita ou pela via de retroconversão de poliaminas (via SSAT), que consiste na captação de espermina da célula hospedeira, que posteriormente é convertida em espermidina e depois em putrescina. Embora a função destes aminoácidos ainda não esteja totalmente elucidada, poderão ser considerados como futuros alvos no desenvolvimento de novas estratégias quimioterapêuticas contra *T. gondii*.¹¹²



Difluorometilornitina



Dimetilformamida

Figura 2-16: Representação das estruturas da difluorometilornitina e da dimetilformamida.

3 Endoperóxidos

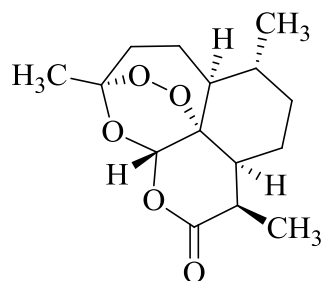
3.1 Descoberta da artemisinina

A mortalidade e morbidade devidas à malária afetam a humanidade há vários milénios. No século XX, a disponibilização do quinino a custo acessível para uma vasta gama da população nas zonas do globo onde a malária é endémica possibilitou o tratamento, com redução da mortalidade. Em meados deste século surgiram outros fármacos de origem sintética, como a cloroquina e os antifolatos, também usados no combate à malária.^{175,176} Durante a guerra entre o Vietname e os EUA verificou-se que a malária causada por *Plasmodium falciparum* apresentava resistência aos fármacos convencionais, nomeadamente à cloroquina tendo-se descoberto mais tarde que a resistência resultava de mutações no gene que codifica o transportador da cloroquina no vacúolo digestivo PfCRT.¹⁷⁷ Entretanto desenvolveu-se nos EUA a mefloquina, um composto usado contra parasitas resistentes à cloroquina. O Vietname, no entanto, não reunia as condições necessárias para proceder à investigação e, face à numerosa perda de soldados com malária durante a guerra, pediu ajuda à China^{175,178} que, como resposta ao Vietname, iniciou em 1967 uma investigação sobre compostos antimaláricos, tendo por base a medicina tradicional chinesa, intitulada de “Projeto 523”.¹⁷⁹ Este projeto conduziu à descoberta do princípio ativo artemisinina (em chinês, “qinghaosu”), encontrada essencialmente nos extratos orgânicos das folhas de *Artemisia annua* L. Apesar de ter sido reportado que a planta inibia o crescimento do parasita em 68%, esta atividade não era reprodutível, verificando-se em estudos posteriores uma inibição de entre 12% a 40%.^{179,180} Esta variação na atividade antimalárica era influenciada por múltiplos fatores, incluindo a origem geográfica da planta, variação sazonal, as partes da planta colhidas (folhas ou caule) e, sobretudo, os métodos utilizados na extração.¹⁸⁰ Após extensos estudos, a investigadora Tu You You percebeu que os métodos de ebulição e extração a alta temperatura podiam destruir o ingrediente ativo, conduzindo a uma capacidade inibitória menor.¹⁷⁸ A substituição do éter por etanol como solvente de extração, a baixas temperaturas, permitiu melhorar o rendimento de extração, preservando o princípio ativo e garantindo assim uma atividade antimalárica dos isolados reprodutível.¹⁷⁹ Também possibilitou o isolamento da artemisinina, o que foi fundamental para o futuro desenvolvimento dos fármacos baseados neste composto. Por outro lado, a toxicidade do extrato era significativa, uma vez que eram usados extratos secos. Face a esta

desvantagem, a Professora Tu começou a descartar as zonas mais azedas da planta, que conferiam acidez aos extratos. Os estudos conduziram ao extrato número 191, um extrato neutro que revelou toxicidade reduzida e atividade antimalárica melhorada.^{175,181} Em 1971, a Professora Tu enviou o extrato 191 para testes, obtendo uma efetividade de 100% em roedores com malária causada pelo *P. cynomolgi*. Um ano depois, em Pequim, foram realizados ensaios clínicos com o extrato 191 em 21 pacientes com malária causada por *P. vivax* ou por *P. falciparum* e os resultados obtidos indicaram um potencial inibitório contra a infecção superior a 90%.^{175,181,182} Após os testes em humanos procedeu-se à caracterização química e ao estudo do composto ativo, a artemisinina, cuja estrutura está representada na Figura 3-1.¹⁷⁹

3.2 Artemisinina

O Grupo de Pesquisa de Coordenação Antimalárica de *Qinghaosu*, demonstrou em 1972 que a artemisinina é uma lactona sesquiterpénica.¹⁸³ Como indicado na Figura 3-1, a estrutura da ART integra uma ligação peróxido incorporada num anel de 1,2,4-trioxano. Verificou-se que este anel é essencial para a atividade antimalárica, ou seja, é o farmacóforo.¹⁸⁴



Artemisinina

Figura 3-1: Representação da estrutura da artemisinina.

A artemisinina forma cristais incolores em forma de agulha, com um ponto de fusão entre 156 e 157 °C.¹⁸⁵ Devido ao desenvolvimento de resistências à cloroquina e aos antifolatos, a primeira linha de tratamento para a malária mudou para o produto natural artemisinina.⁹⁷ Este composto, que atua em concentrações nanomolares, é utilizado desde os anos 80 do Sec. XX no tratamento da malária provocada por estirpes

de *P. falciparum* multi-resistente. A elevada eficácia da artemisinina levou a OMS a considerá-la como escolha de primeira linha para o tratamento da malária.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ É absorvida rapidamente (embora de forma incompleta), sendo as concentrações plasmáticas máximas atingidas após 1-2 horas. De um modo geral, a artemisinina é um fármaco seguro e bem tolerado. A probabilidade de efeitos adversos em humanos é baixa, sendo as queixas mais comuns náuseas, vômitos, anorexia e tonturas. Estudos para avaliação da mutagenicidade em animais revelaram que a artemisinina não é mutagénica. Na gravidez, pode ser utilizada no segundo e terceiro trimestres, não sendo contudo recomendada no primeiro trimestre.¹⁸⁹

A artemisinina possui algumas limitações, de que destacamos a baixa solubilidade da molécula, quer em água quer em óleo, um tempo de semivida curto e biodisponibilidade limitada.^{186,190,191} A planta, *Artemisia annua* L., apresenta um baixo teor de artemisinina, o que inviabiliza extrações eficientes. A síntese química da artemisinina é difícil e economicamente inviável, devido ao baixo rendimento.^{190,191} Todavia, o surgimento de estirpes de *Plasmodium* resistentes à artemisinina constitui a maior limitação no uso desta molécula. A correlação entre os SNPs (*single nucleotide polymorphism*) existentes na enzima *pfatp6* (*Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase*, SERCA) e a diminuição da suscetibilidade de *P. falciparum* à artemisinina foi evidenciada como um dos indicadores de resistência. Também se verificou que na espécie *Plasmodium yoelli*, o número de cópias do gene 1 de multirresistência está correlacionado com a resistência à artemisinina. A otimização das propriedades farmacológicas da artemisinina conduziu ao desenvolvimento de derivados semissintéticos da mesma e, mais tarde, de análogos sintéticos, endoperóxidos estruturalmente mais simples mas com elevadas atividades *in vitro* e *in vivo*, revelando potencial para o tratamento da malária e também de outras infeções parasitárias.¹⁸⁷

3.3 Derivados da artemisinina

A procura de derivados semissintéticos de artemisinina, quimicamente mais estáveis, com farmacocinética melhorada e com menor toxicidade que o composto natural, conduziu ao desenvolvimento de um grande número de derivados, muitos dos quais com melhor eficácia contra o parasita da malária do que o composto parente.¹⁸⁷ Os derivados de artemisinina com alterações estruturais no carbono C-10, demonstraram eficácia na

inibição da infecção provocada por *T. gondii*. Verificou-se também que essa inibição ocorre em mais de uma etapa do ciclo lítico do parasita, incluindo o crescimento, a replicação e a capacidade de invasão de *T. gondii*.¹⁹² Estes compostos provocam um aumento de cálcio no interior do parasita o que conduz à libertação precoce da enzima MIC2, implicada no processo de invasão da célula hospedeira pelo parasita. Estudos de avaliação da suscetibilidade de *T. gondii* aos derivados semissintéticos (Figura 3-2) revelaram que a artemisona (1) apresenta a maior potência, seguida do artesunato de sódio (2), que apresenta potência semelhante ao arteméter (3). A dihidroartemisinina (5) apresenta uma menor potência que os compostos anteriormente referidos, mas superior à exibida pela artemisinina.¹⁸⁷

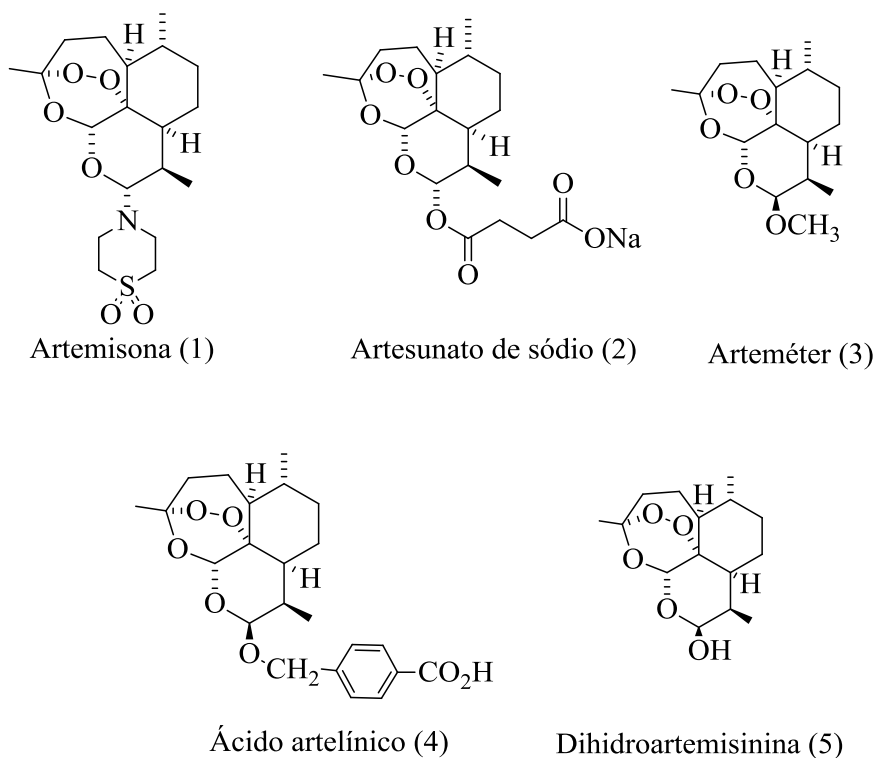


Figura 3-2: Representação das estruturas dos derivados da artemisinina, a artemisona (1), o artesunato de sódio (2), o arteméter (3), o ácido artelínico (4) e o seu análogo dihidroartemisinina (5).

A artemisona (1) é uma 10-alkilaminoartemisinina que foi desenvolvida como um potente fármaco antimalárico. Demonstrou possuir excelentes características farmacodinâmicas e farmacocinéticas, como um tempo de semivida de 3,1 horas, sendo também bem tolerada.^{193,194} De entre os derivados de artemisinina que atingiram fases

avançadas de desenvolvimento como fármacos, a artemisona revelou ser o inibidor mais potente do crescimento de *T. gondii in vitro*. Adicionalmente, a artemisona apresenta neurotoxicidade significativamente reduzida em comparação com a dihidroartemisinina, exibindo um perfil farmacocinético superior para os seres humanos.¹⁹³

O artesunato de sódio (2) é um éster que sofre degradação metabólica, sendo rapidamente hidrolisado em dihidroartemisinina. Apresenta um tempo de semivida de vários minutos, enquanto a dihidroartemisinina apresenta um tempo de semivida entre 40 e 60 minutos.¹⁸⁶ O artesunato de sódio (2) é solúvel em água, sendo geralmente administrado por via intravenosa. É um análogo seguro da artemisinina, com ação rápida.¹⁹⁵ Ensaio *in vitro* mostraram que o artesunato exibe elevada eficácia contra taquizoítos de *T. gondii*, podendo constituir uma alternativa à terapêutica padrão da toxoplasmose, baseada em anti metabolitos (combinação pirimetamina-sulfonamida).¹⁹⁶

O arteméter (3) é um fármaco solúvel em óleo, sendo bem absorvido quando administrado por via intramuscular. Este derivado de artemisinina é seguro, de ação rápida e eficaz. Apesar da instabilidade hidrolítica desta molécula, esforços de otimização resultaram no ácido artelínico (4), uma molécula mais estável e menos tóxica.¹⁹⁵ Embora o arteméter tenha revelado toxicidade no decurso de estudos em modelos animais, estudos realizados mais recentemente mostraram ausência de morte neuronal em doentes que receberam doses elevadas de arteméter, administrado por injeção intramuscular.¹⁸⁶

A dihidroartemisinina (5) é o composto formado por redução da artemisinina, e revelou ser cerca de sete vezes mais potente que esta em ensaios *in vitro*. Ao contrário da artemisinina, a dihidroartemisinina é solúvel em água.¹⁸¹ A artemisona (1), o artesunato de sódio (2), o arteméter (3) e o ácido artelínico (4) são pró-fármacos mais solúveis que a artemisinina e são rapidamente convertidos em dihidroartemisinina no plasma.⁹⁷ Por ser mais potente que a artemisinina, a dihidroartemisinina constituiu a base para o desenvolvimento de derivados lipofílicos e hidrofílicos estáveis.¹⁹⁷

3.4 Sobre o mecanismo de ação da artemisinina

Apesar da extensa investigação sobre o mecanismo de ação da artemisinina este tema permanece sob intenso debate.^{198,199} De entre os modelos postulados para representar este processo, salienta-se o "modelo de cisão redutiva" e o "modelo de

peróxido aberto", representados na Figura 3-3, não havendo contudo um consenso total sobre os mesmos.^{198,199}

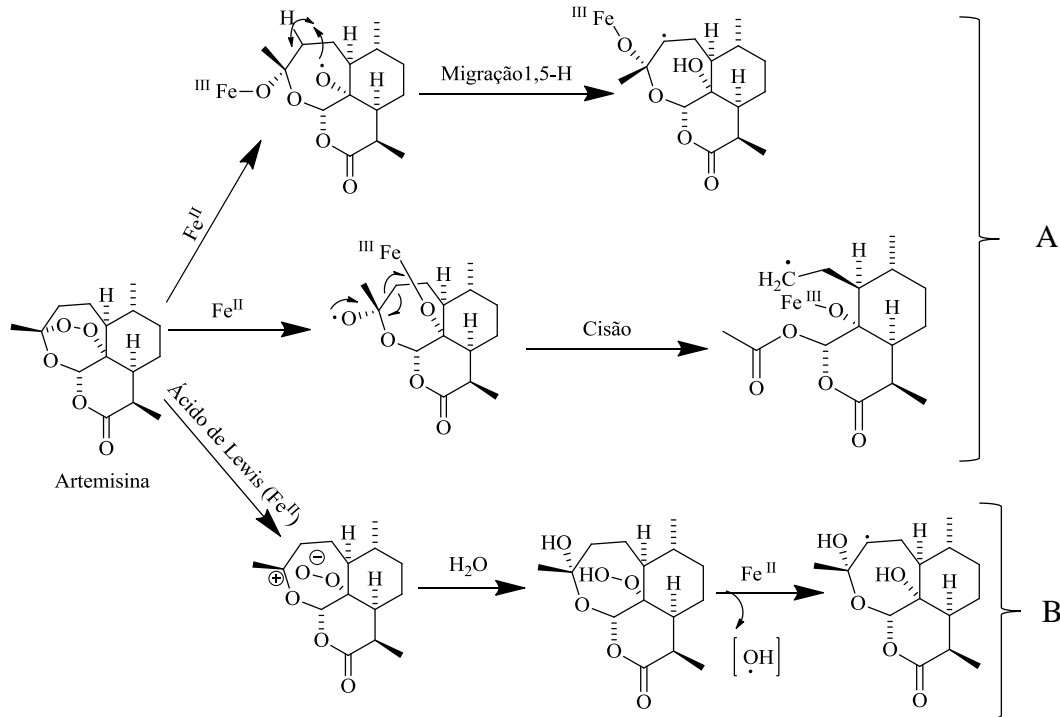


Figura 3-3: Representação dos dois mecanismos de bioativação da artemisinina, A) Modelo da cisão redutiva e B) Modelo do peróxido aberto

O modelo da cisão redutiva assume que após a ligação do ferro (II) à artemisinina ocorre transferência de um elétron, induzindo a cisão homolítica da ponte de peróxido e formando radicais centrados no oxigênio. Estas espécies intermediárias rearranjam, formando radicais centrados em carbono que podem alquilar o heme ou biomoléculas fundamentais para o parasita.

Já o modelo de peróxido aberto defende que a abertura do anel resulta da protonação do peróxido ou da complexação do mesmo com o ferro reduzido. O ferro atua como um ácido de Lewis, facilitando a bioativação iônica, em vez da radicalar. O átomo de oxigênio fornece estabilização da carga positiva e reduz a energia necessária para a abertura do anel, facilitando este processo. A clivagem da ponte de endoperóxido e a posterior captação de água levam à formação de um hidroperoxido insaturado, capaz de modificar irreversivelmente os resíduos de proteínas por oxidação direta.¹⁹⁸

Relativamente à natureza/origem do ferro responsável pela bioativação da artemisinina e seus derivados em eritrócitos infetados por *Plasmodium* também foram levantadas algumas hipóteses, podendo este ser oriundo do grupo heme ou de enzimas contendo ferro ou tratar-se de ferro livre intracelular. Nos eritrócitos infetados, a artemisinina pode ser ativada pelo heme que é libertado durante a digestão da hemoglobina no vacúolo digestivo do parasita, um processo crucial para a obtenção dos aminoácidos necessários ao seu crescimento. O Fe(II) livre também atua como ativador da artemisinina, levando a reações que inibem o crescimento do parasita. Outras enzimas parasitárias contendo ferro, além do grupo heme, também podem ser consideradas como ativadoras na bioativação de endoperóxidos.^{187,200,201}

Posteriormente a este processo de ativação, os compostos radicalares resultantes têm a capacidade de interagir com várias funções do parasita, incluindo a interrupção da própria via de desintoxicação do heme, pois estes compostos podem alquilar ou oxidar proteínas e lípidos existentes nos eritrócitos parasitários e o grupo heme. Estudos posteriores mostraram que a atividade da enzima PfATP6, uma ATPase de *P. falciparum* dependente de cálcio que está presente no retículo endoplasmático, também denominada de SERCA, é abolida pela artemisinina, não sendo contudo, afetada por outros antimaláricos que não possuem a ponte endoperóxido. Esta atividade pode estar relacionada com o facto de a artemisinina possuir uma estrutura semelhante à tapsigargina, um inibidor conhecido da SERCA.^{187,199,200,202}

Quanto à utilização de artemisinina e derivados contra *T. gondii*, o conhecimento ainda é escasso. Sabe-se que a suscetibilidade deste parasita para a artemisinina é 50 vezes menor do que a exibida pelos parasitas causadores de malária.²⁰⁰ O trabalho de Nagamune, Beatty e Sibley²⁰³ mostrou que a artemisinina perturba a homeostasia do cálcio em *T. gondii*, reforçando que as ATPases dependentes de cálcio são alvos de fármacos antiparasitários derivados da artemisinina, defendida com base em estudos com modelos de *Plasmodium*. O cálcio intracelular controla vários eventos celulares cruciais em parasitas Apicomplexa, incluindo a libertação de proteínas, a motilidade, a invasão e a saída das células do hospedeiro. O tratamento com artemisinina aumenta a periodicidade das oscilações de cálcio, interrompendo todas as funções associadas a este elemento.²⁰³

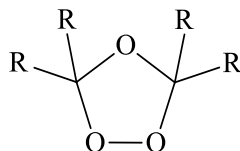
3.5 Peróxidos sintéticos como agentes antitoxoplasmáticos

De acordo com um estudo da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2016 a toxoplasmose atingia mais de 2 milhões de pessoas na Europa, sendo atualmente considerada uma infecção parasitária negligenciada.²⁰⁴ A quimioterapia da toxoplasmose envolve, em primeira linha, a administração de fármacos usados no tratamento de outras patologias, como a sulfadiazina, a pirimetamina e o ácido folínico, frequentemente usados em terapêuticas de combinação. No entanto este arsenal terapêutico evidencia fragilidades, incluindo toxicidade e eficácia reduzida, devido ao desenvolvimento de resistências. Estas fragilidades são agravadas pela necessidade de tratamentos prolongados, podendo conduzir a recrudescência da infecção.^{5,93}

Foi equacionada a utilização de endoperóxidos no tratamento de toxoplasmose, devido à elevada eficácia demonstrada por esta classe farmacológica noutros modelos parasitários. Os endoperóxidos de primeira geração incluem a artemisinina e vários derivados semissintéticos desta que foram desenvolvidos para o tratamento da malária.^{205,206} Verificou-se que estes compostos exibem capacidade inibidora da replicação do parasita *T. gondii in vitro*. Todavia, embora com propriedades farmacológicas muito boas, como uma ação rápida e com baixos níveis de toxicidade, as artemisininas apresentam algumas fragilidades ao nível da absorção, da biodisponibilidade e do tempo de semivida. As artemisininas são metabolicamente convertidas em dihidroartemisinina, que apresenta alguma toxicidade ao nível do SNC.^{205,207} Acresce que os rendimentos de extração da artemisinina são baixos e os processos de produção dos derivados da artemisinina, obtidos por semissíntese, são longos e dispendiosos, sobretudo considerando a economia das regiões onde as infecções parasitárias negligenciadas são endémicas.

As questões suprarreferidas estimularam o desenvolvimento de endoperóxidos de segunda geração, de origem sintética, com estruturas mais simples que a da artemisinina e que podem ser disponibilizados a custos inferiores. De entre as várias bibliotecas preparadas foram selecionadas as moléculas que evidenciaram propriedades farmacológicas superiores às das artemisininas.²⁰⁸ Os compostos sintéticos são favorecidos pela sua simplicidade estrutural, viabilidade económica, síntese escalável, atividade aumentada e um perfil biofarmacêutico melhorado.²⁰⁹

A Figura 3-4 representa a estrutura química dos -1,2,4-trioxolanos, também denominados por ozonídeos. Griesbaum descobriu que os ozonídeos secundários poderiam ser obtidos por ozonólise de cetonas na presença de outros compostos carbonílicos.^{207,210} Uma vez que não possuem hidrogénios alfa, existe impedimento às reações de fragmentação heterolítica do peróxido, que dariam origem à formação de compostos carbonílicos, o que aumenta a estabilidade química destes compostos.²¹⁰



1,2,4-trioxolano

Figura 3-4: Representação química da estrutura geral dos 1,2,4-trioxolanos.

No processo de desenvolvimento de peróxidos sintéticos com boas propriedades farmacológicas concluiu-se que os trioxolanos mais lipofílicos tendem a apresentar maior biodisponibilidade oral, mas menor estabilidade metabólica. O padrão seguido no desenvolvimento de trioxolanos baseia-se numa entidade espiro-cíclica dupla em que o anel de trioxolano é flanqueado por dois substituintes carbocíclicos, um grupo adamantilo e outro ciclohexilo, sendo este geralmente substituído.²¹¹ Os estudos desenvolvidos no âmbito da descoberta de endoperóxidos com atividade antimalárica revelaram que o sistema espiro-adamantílico favorece a atividade, que é reforçada pelos substituintes mais hidrofóbicos na cadeia lateral do substituinte ciclohexílico.^{207,211} Verificou-se que os trioxolanos com uma ampla gama de substituintes neutros e básicos apresentam em geral bons perfis antimaláricos, ao contrário dos que possuem substituintes mais ácidos.²⁰⁷

O ozonídeo OZ277 (Figura 3-5), também conhecido como maleato de arterolano, foi o primeiro trioxolano sintético a ser avaliado clinicamente para o tratamento da malária. Como as artemisininas, o OZ277 contém uma ligação peroxídica que é essencial para a atividade antimalárica, exibindo potência muito elevada contra vários estágios de *P. falciparum*.²¹² Este fármaco antimalárico, administrado por via oral, possui um início de ação rápido e eficácia elevada, tanto *in vitro* como *in vivo*, é bem tolerado e apresenta muito menos efeitos colaterais,²¹³ comparativamente a outros endoperóxidos utilizados. Na fase I dos ensaios clínicos, o arterolano conduziu a uma taxa de depuração

parasitária de 90%. No entanto, o tempo de semivida (1 a 3 h) foi apenas duas a três vezes superior ao da dihidroartemisinina, o metabolito ativo obtido a partir de derivados de artemisinina semissintéticos. Adicionalmente, o OZ277 apresentou exposição plasmática reduzida quando administrado a doentes com malária em regime de monoterapia.²¹²

Para alcançar uma cura oral de dose única, o principal desafio foi aumentar o tempo de semivida e também melhorar o perfil de exposição no sangue. As investigações para otimização farmacológica conduziram à seleção de um novo candidato antimalárico, o ozonídeo OZ439 (Figura 3-5), designado por artefenomel, com propriedades farmacocinéticas e antimaláricas melhoradas relativamente ao OZ277.²¹²

O artefenomel (OZ439) é um novo trioxolano sintético com propriedades farmacocinéticas melhoradas em comparação com outros fármacos antimaláricos do tipo endoperóxido, incluindo os derivados de artemisinina. O tempo de semivida do artefenomel em doentes com malária varia entre 46 e 62 horas, sendo bastante superior ao observado para os endoperóxidos de primeira geração. A eliminação mais lenta do artefenomel permite a sua acumulação na corrente sanguínea por um intervalo de tempo superior, o que proporciona uma proteção mais prolongada contra o surgimento de resistências a fármacos parceiros e minimiza a recrudescência.^{212,214}

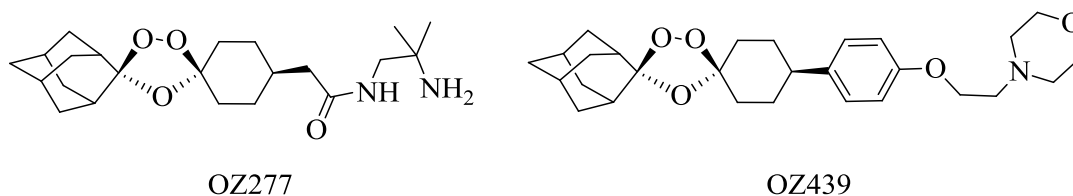
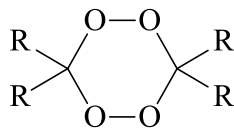


Figura 3-5: Representação química da estrutura dos antimaláricos OZ277 (maleato de arterolano) e do OZ439 (artefenomel).

A instabilidade da molécula OZ277 em doentes com malária estimulou investigações no sentido da sua otimização, o que resultou no antimalárico OZ439, e também na procura de outras classes de endoperóxidos. Os estudos de estabilidade de endoperóxidos demonstraram que os 1,2,4,5-tetraoxanos possuem maior estabilidade do que os 1,2,4-trioxolanos, o que suscitou um maior interesse no desenvolvimento destes compostos como agentes antimaláricos.²¹⁵ Os tetraoxanos (Figura 3-6) apresentam duas ligações endoperóxido, são mais fáceis de obter do que as artemisininas e alguns dos

tetraoxanos preparados mostraram atividade antimalárica semelhante à exibida pelas artemisininas e trioxolanos selecionados para desenvolvimento.²¹⁶



1,2,4,5 - Tetraoxano

Figura 3-6: Representação química da estrutura geral de 1,2,4,5-tetraoxanos.

Como patógenos intracelulares, tanto o *Plasmodium spp.* como o *T. gondii* dependem da invasão de células hospedeiras para assegurar a sua sobrevivência e proliferação. Uma vez que ambos os parasitas pertencem ao mesmo filo Apicomplexa, eles apresentam vias metabólicas comuns, podendo ser suscetíveis aos mesmos fármacos, para prevenção ou tratamento das doenças que causam. A artemisinina e os seus derivados semissintéticos são exemplos de fármacos que apresentam atividade contra *Plasmodium spp.* e contra os parasitas *T. gondii*. Os estudos realizados indicaram que os peróxidos atuam em *T. gondii* interferindo na homeostasia do cálcio. Um estudo conduzido por Opsenica e a sua equipa, que envolveu testes *in vivo* para avaliação da atividade de tetraoxanos contra a toxoplasmose aguda em murganhos, sugeriu que a efetividade destes compostos sintéticos contra *T. gondii* poderá abrir um novo caminho no desenvolvimento de terapêuticas antitoxoplasmáticas mais vantajosas.²¹⁷

3.6 Preparação de trioxolanos e tetraoxanos para avaliação da sua atividade antitoxoplasmática

Com a intensificação da investigação centrada no desenvolvimento de novas soluções para quimioterapia da toxoplasmose foram identificados potenciais candidatos a fármacos. Os contributos permitiram ampliar o leque de moléculas e também desenvolver estratégias de otimização que permitam mitigar as fragilidades dos fármacos já existentes. Vários estudos desenvolvidos ao longo dos anos comprovaram a eficácia dos peróxidos derivados de artemisinina contra os parasitas Apicomplexa. Assim acreditamos que o desenvolvimento de peróxidos sintéticos com atividade antitoxoplasmática deve ter em conta o conhecimento existente. No caso dos trioxolanos,

foi demonstrada a importância do sistema espiro-adamantilo para a atividade da molécula, que é reforçada por substituintes mais hidrofóbicos na cadeia lateral ao grupo ciclohexilo. Assim, o padrão seguido no desenho de peróxidos consiste na preparação de uma entidade espiro-cíclica dupla, em que o anel de trioxolano ou tetraoxano é inserido entre um anel adamantilo e um anel ciclohexilo que pode ser funcionalizado, permitindo a introdução de diversidade estrutural.

A presente dissertação foi complementada por um projeto laboratorial que consistiu na síntese de 1,2,4,5-tetraoxanos e de 1,2,4-trioxolanos com potencial atividade contra *Toxoplasma gondii*. O trabalho foi desenvolvido no grupo de Reatividade Orgânica e Química Medicinal (OrgMedChem) do CCMAR e contou com o apoio do projeto PTDC/MAR-BIO/4132/2014, “*Reversing the pathophysiology of Perkinsosis in clams hatcheries through the use of analogues of Artemisinin.*”

Neste capítulo serão apresentadas e discutidas as metodologias de síntese utilizadas na preparação de 1,2,4,5-tetraoxanos e de 1,2,4-trioxolanos. Os compostos preparados encontram-se identificados pelas iniciais do nome da autora, seguido de um número. A descrição detalhada das sínteses de todos os compostos preparados pela autora no âmbito deste trabalho está disponível na parte experimental (secção 3.7).

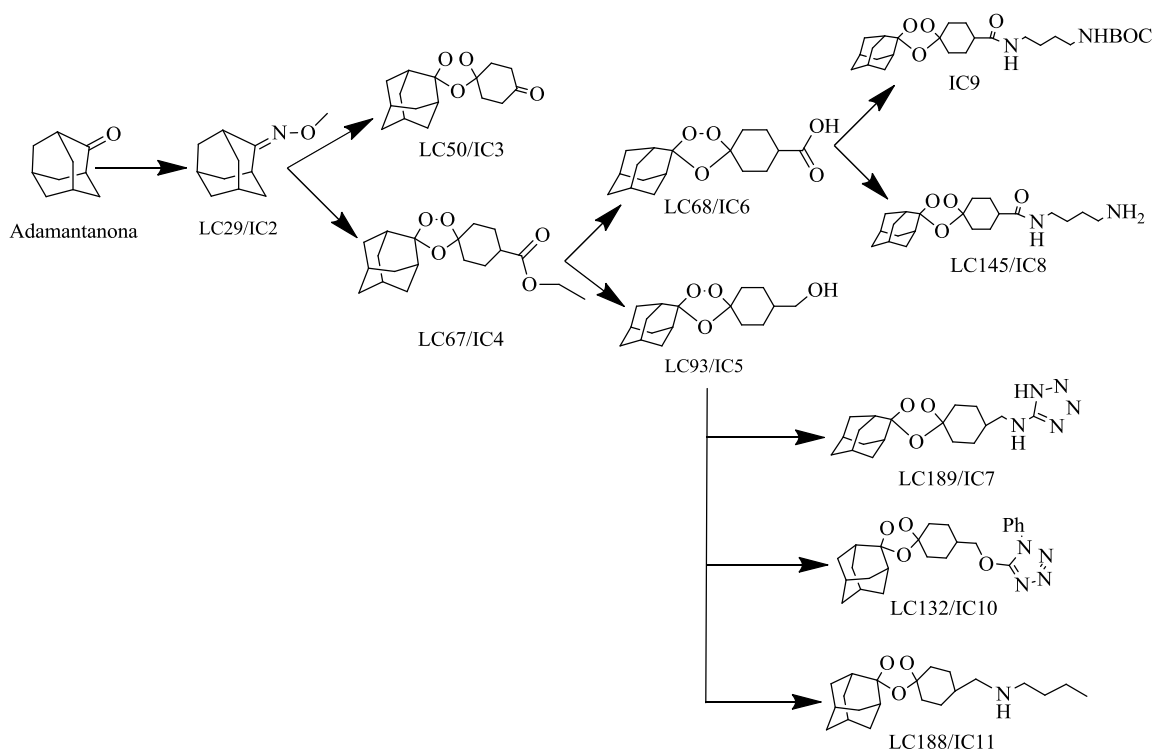


Figura 3-7: Esquema das sínteses de trioxolanos realizadas experimentalmente.

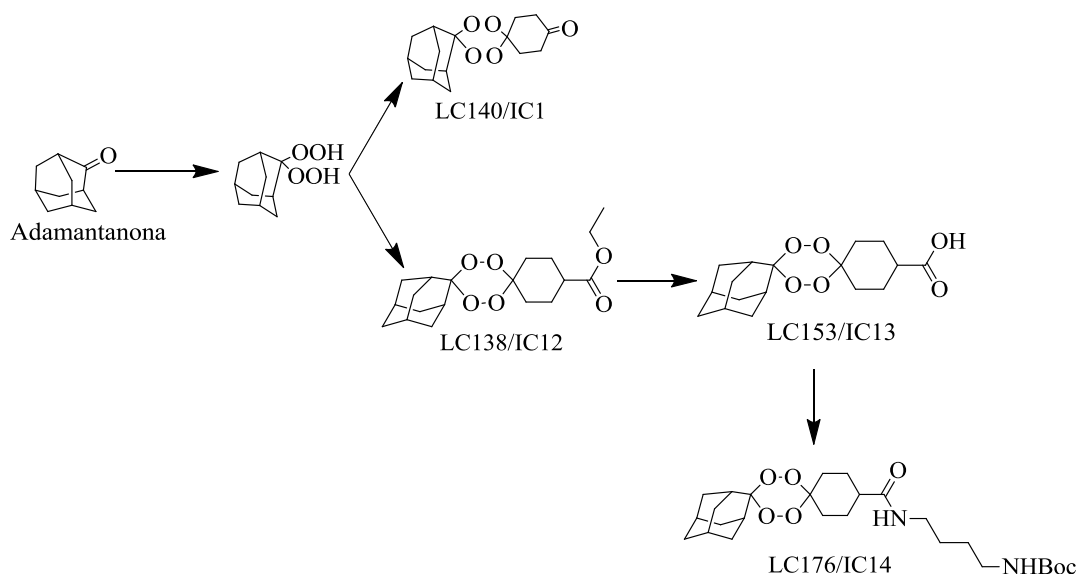


Figura 3-8: Esquema das sínteses de tetraoxanos realizadas experimentalmente.

i. Síntese da adamantil-metil-oxima IC2/LC29

A reação de conversão da adamantanona na adamantil-metil-oxima (IC2) encontra-se representada na figura 3-9. Adaptou-se um procedimento de síntese descrito na literatura.²⁰⁸ O composto desejado foi obtido com um rendimento de 94%. O processo de transformação da adamantanona em metil-oxima corresponde à primeira etapa na síntese de trioxolanos. Este bloco de construção foi usado como composto de partida na síntese dos trioxolanos preparados no âmbito da dissertação.

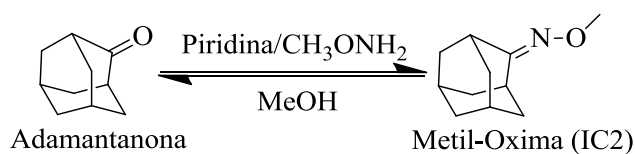


Figura 3-9: Esquema de síntese da metil-oxima a partir da adamantanona.

O mecanismo da reação de formação da metil-oxima encontra-se representado na Figura 3-10.

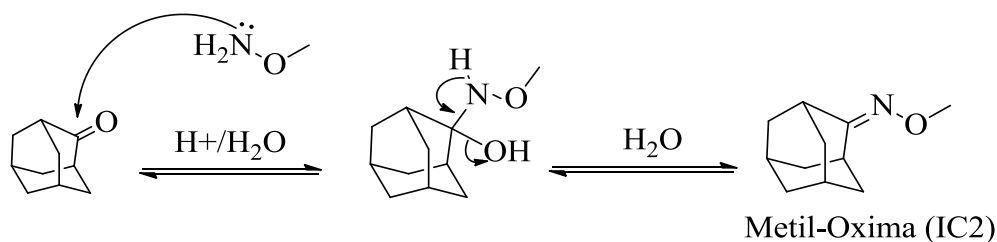


Figura 3-10: Representação da proposta mecanística de síntese da metil-oxima IC2, partindo da adamantanona.

ii. Síntese do trioxolano IC3/LC50

A reação de conversão da adamantil-metil-oxima (IC2) no trioxolano IC3 encontra-se representada na figura 3-11. Para o acoplamento por ozonólise, para a preparação de trioxolanos adaptou-se um procedimento descrito na literatura.²⁰⁸ O composto desejado foi obtido com um rendimento de 29%.

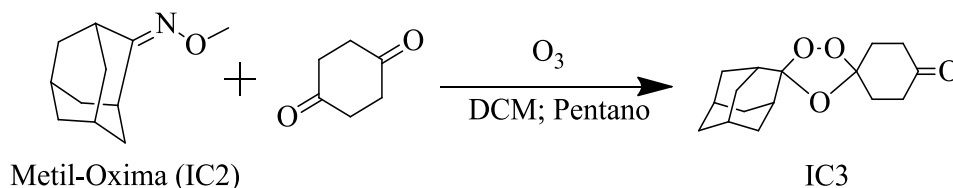


Figura 3-11: Esquema de síntese do composto IC3.

Para proceder ao acoplamento por ozonólise da ciclohexadiona com a metil oxima IC2 é necessário que todo o sistema seja saturado com ozono antes de se iniciar a reação. O ambiente envolvente deve ser anidro, já que o procedimento de ozonólise envolve um sistema fechado.

Na Figura 3-12, apresenta-se a proposta mecanística para a síntese do trioxolano IC3.

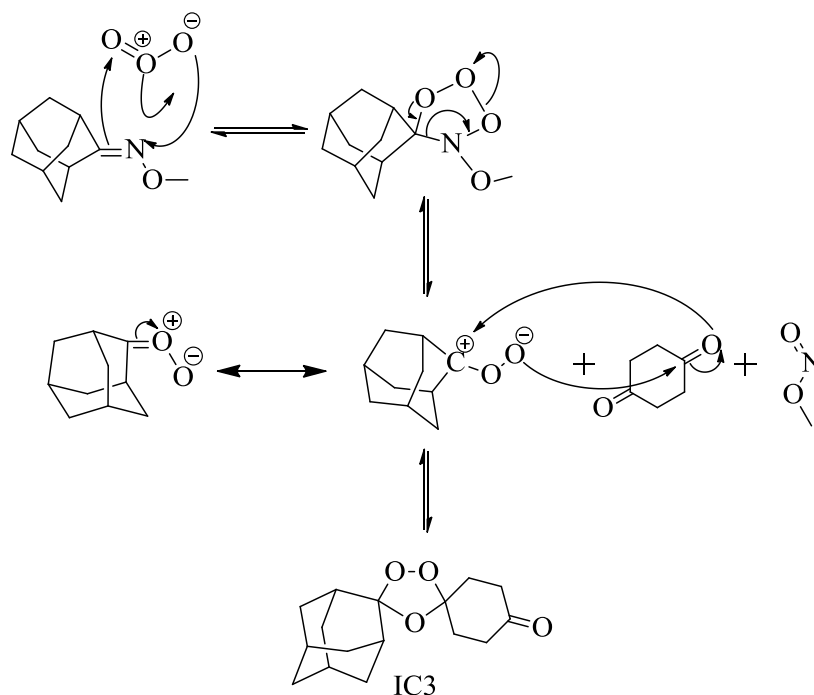


Figura 3-12: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC3.

iii. Síntese do trioxolano IC4/LC67, por ozonólise

O esquema representativo do mecanismo da conversão da metil-oxima no composto IC4 encontra-se ilustrado na Figura 3-13. Adaptou-se um procedimento de síntese descrito na literatura,²⁰⁸ tendo-se obtido o trioxolano IC4 com um rendimento de 36%.

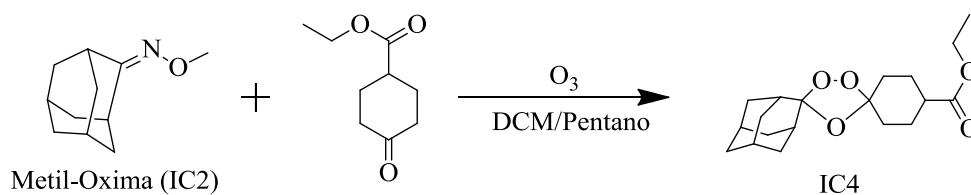


Figura 3-13: Representação da reação de conversão do composto IC2 no trioxolano IC4.

A proposta mecanística da síntese do trioxolano IC4 é semelhante à síntese do trioxolano IC3, na figura 3-12.

iv. Síntese do trioxolano IC5/LC93

A conversão do grupo éster do trioxolano IC4 em álcool, originando o ozonídeo (IC5), encontra-se ilustrado na Figura 3-14. Adaptou-se um procedimento de síntese descrito na literatura,²⁰⁸ tendo-se obtido o trioxolano IC5 com um rendimento de 88%.

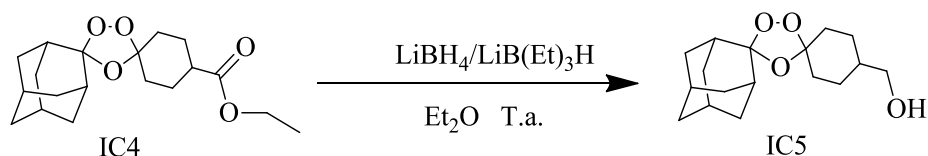


Figura 3-14: Representação da reação de conversão do composto IC4 no composto IC5.

A Figura 3-15, representa a proposta mecanística reacional associada à síntese do trioxolano IC5.

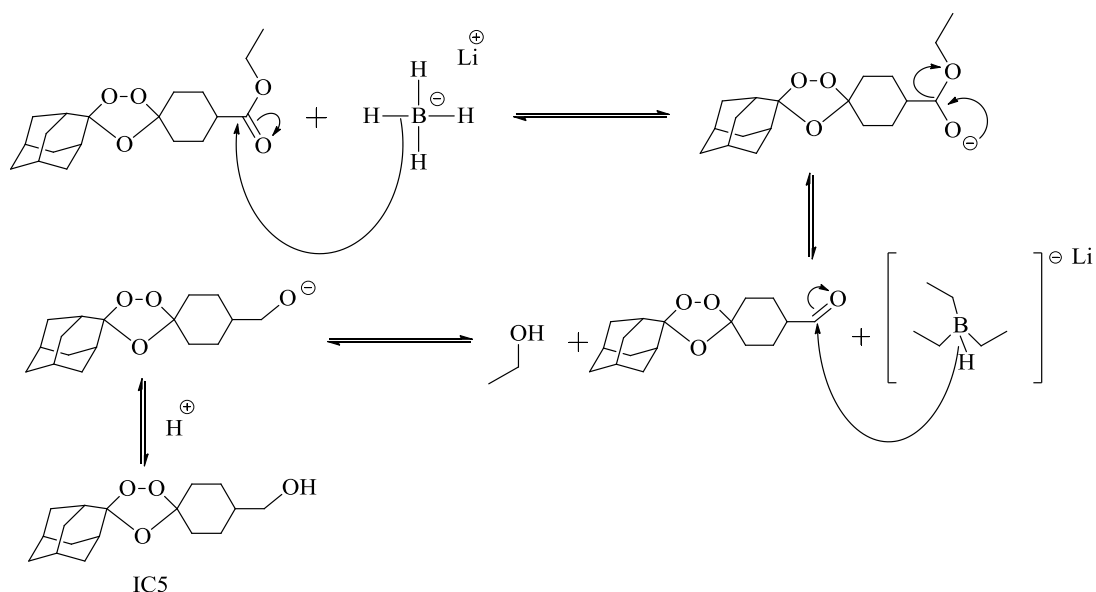


Figura 3-15: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC5.

v. Síntese do trioxolano IC6/LC68

O processo de conversão do trioxolano IC4 no trioxolano IC6 envolve a hidrólise do grupo éster, como ilustrado na Figura 3-16. Adaptou-se um procedimento de síntese descrito na literatura.²⁰⁸ O trioxolano IC6 foi obtido com um rendimento de 90%.

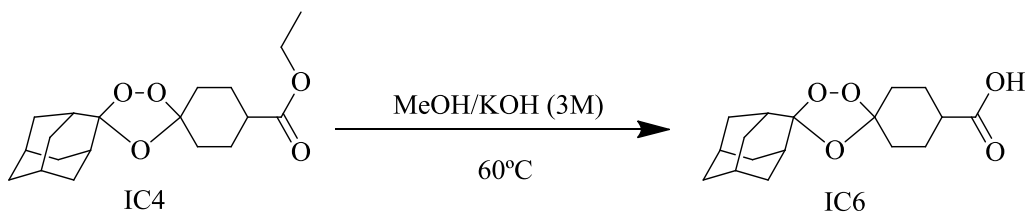


Figura 3-16: Representação da reação de conversão do composto IC4 no composto IC6.

A Figura 3-17, representa a proposta mecanística do processo de hidrólise para obtenção do ozonídeo IC6.

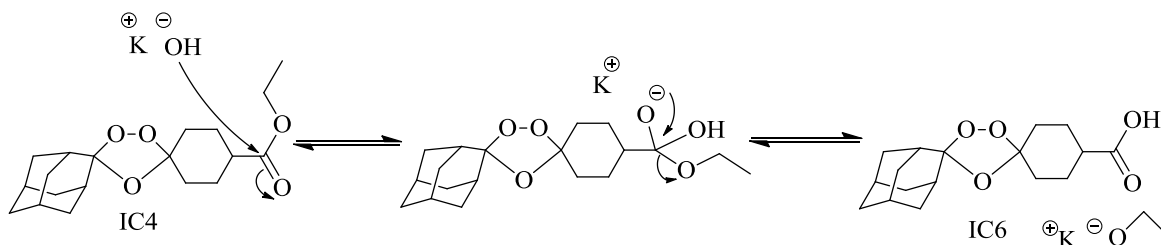


Figura 3-17: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC6, a partir de IC4.

vi. Síntese do trioxolano IC7/LC189

O esquema representativo da conversão do trioxolano IC5 no conjugado IC7 está ilustrado na Figura 3-18. Adaptou-se um procedimento de síntese descrito na literatura.²⁰⁸ O trioxolano IC6 não foi isolado e por consequência, não foi calculado o rendimento desta síntese.

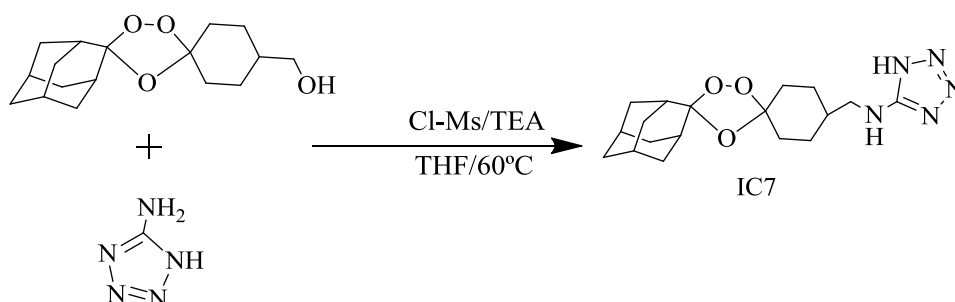


Figura 3-18: Representação da reação de conversão do composto IC4 no composto IC7.

A Figura 3-19, representa a proposta mecanística para os passos de síntese do trioxolano IC7. O hidroxilo do composto IC5 é previamente mesilado, originando um composto intermédio mais reativo relativamente ao acoplamento com 5-aminotetrazole.

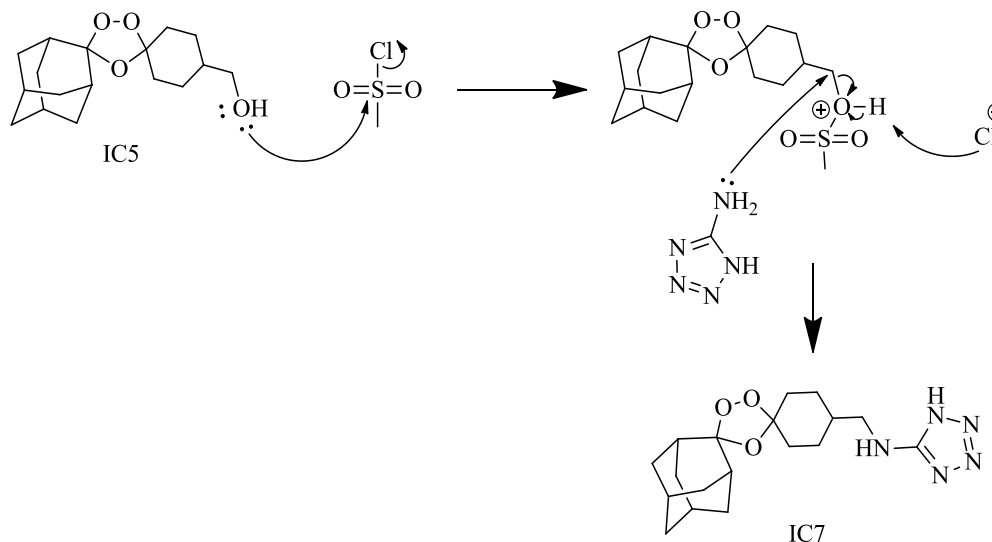


Figura 3-19: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC7.

vii. Síntese do trioxolano IC8/LC145

O esquema representativo da conversão do trioxolano IC6 no composto IC8 encontra-se ilustrado na Figura 3-20. Trata-se do acoplamento da função ácido presente no composto IC6 com um grupo amina do composto 1,4-diaminobutano, formando uma ligação amida. Adaptou-se um procedimento de síntese descrito na literatura,²⁰⁸ tendo sido obtido o trioxolano IC8 com um rendimento de 36%.

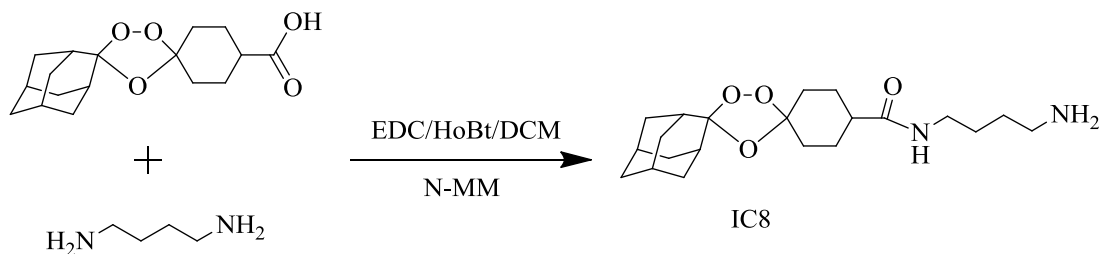


Figura 3-20: Representação da reação de conversão do composto IC6 no composto IC8.

A síntese de amidas pode ser efetuada por acilação de aminas com ácidos carboxílicos ativados. O processo de acoplamento peptídico envolve uma condensação da amina com o ácido carboxílico, mas este é previamente convertido num éster ativo. Durante a preparação de amidas, é essencial a existência de um ambiente anidro no meio reacional para evitar a formação de produtos não esperados, uma vez que a água pode atuar como nucleófilo, comprometendo o sucesso da reação. Para a realização deste tipo de reações usa-se como um dos reagentes 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), que permite a ativação do grupo carboxilo para que a reação com a amina primária seja mais rápida. Com o intuito de reduzir a reatividade deste intermediário, evitar a ocorrência de reações secundárias e aumentar o rendimento da reação, utilizou-se o hidroxibenzotriazol (HOBt), que conduz à formação de um éster menos reativo. O EDC também funciona como agente desidratante, reagindo com a água para formar ureia. Deste modo, a água é removida à medida que se forma, evitando a formação de produtos secundários e deslocando a reação no sentido pretendido. A N-metilmorfolina funciona como base removendo o hidrogênio do grupo carboxílico, o que facilita a reação do grupo carboxilato com o EDC.

Esta reação teve como propósito avaliar se seria possível obter o produto num rendimento razoável ao poupar-se o passo de reação correspondente à protonação de um dos grupos amina com o grupo BOC (tert-butoxicarbonilo).

Na Figura 3-21, encontra-se descrita a proposta mecanística de síntese do trioxolano IC8.

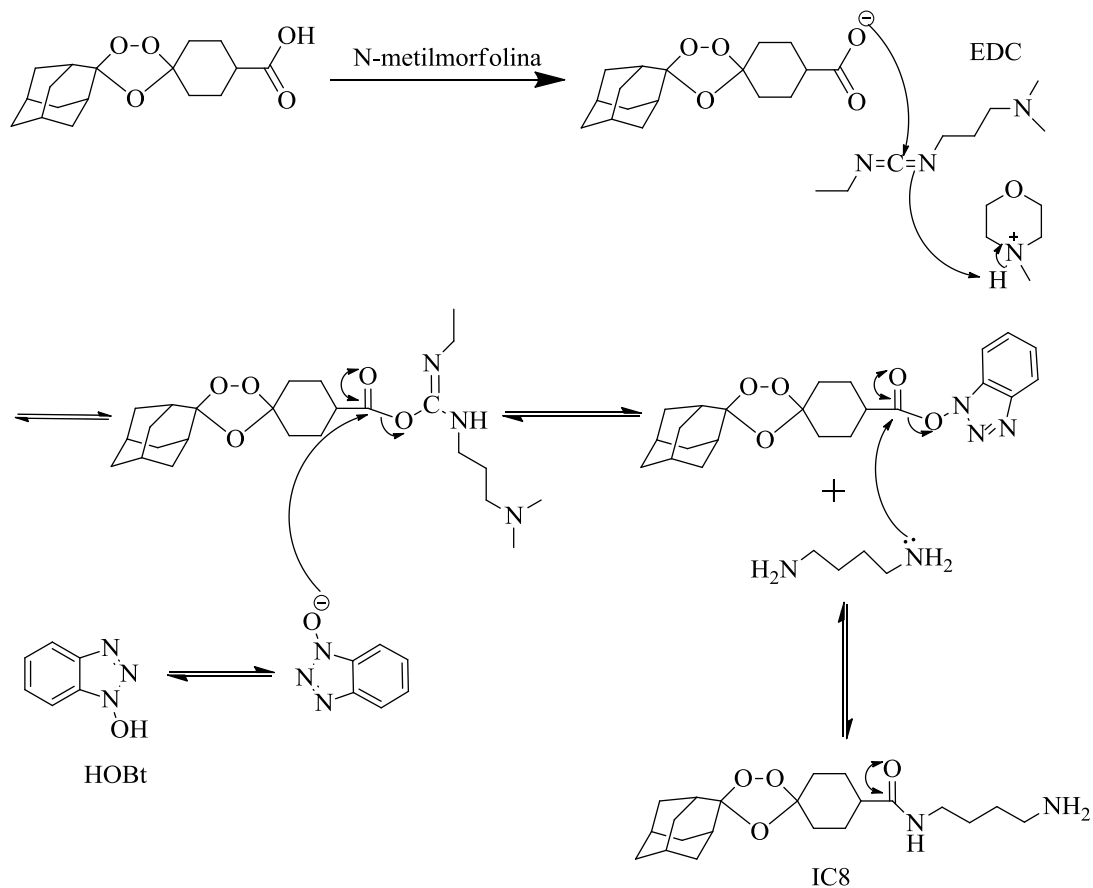


Figura 3-21: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC8.

viii. Síntese do trioxolano IC9

O esquema representativo da conversão do trioxolano IC6 no composto IC9 está ilustrado pela Figura 3-22. Adaptou-se um procedimento de síntese descrito na literatura,²⁰⁸ tendo sido obtido o trioxolano IC9 com um rendimento de 49%.

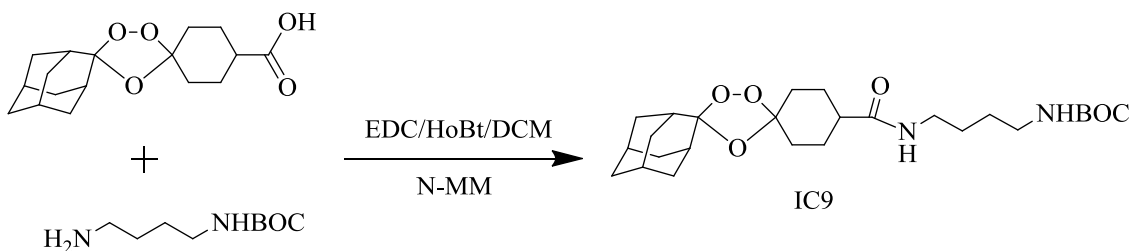


Figura 3-22: Representação da reação de conversão do composto IC6 no composto IC9.

A proposta mecanística é semelhante à apresentada para a síntese do trioxolano IC8, na figura 3-21. Devido à falta de tempo, não foi possível proceder à remoção do grupo protetor BOC no trioxolano IC9, para obter o trioxolano IC8. A remoção é normalmente efetuada em meio ácido. Ainda assim, foi possível concluir que é possível obter o produto desejado poupando um passo de reação.

ix. Síntese do trioxolano IC10/LC132

O esquema da conversão do trioxolano IC5 no composto IC10 encontra-se ilustrado na Figura 3-23. Adaptou-se um procedimento de síntese descrito na literatura,²⁰⁸ tendo sido obtido o trioxolano IC10 com um rendimento de 30%.

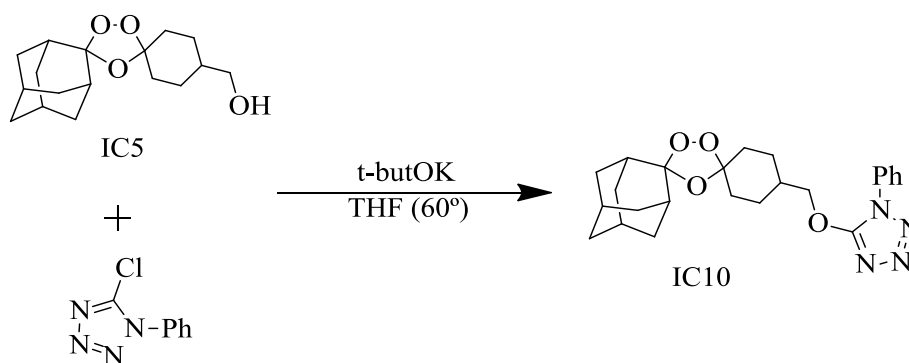


Figura 3-23: Representação da reação de conversão do composto IC5 no composto IC10.

Na Figura 3-24, encontra-se representada a proposta mecanística para a síntese do trioxolano IC10.

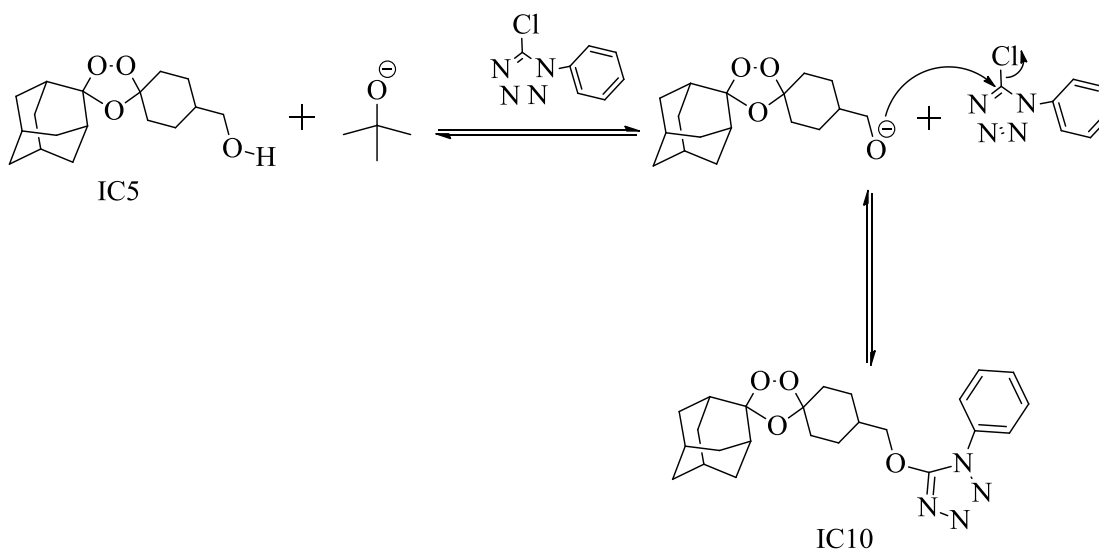


Figura 3-24: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC10.

x. Síntese do trioxolano IC11/LC188

O esquema da conversão do trioxolano IC5 no composto IC11 está ilustrado pela Figura 3-25. Devido à falta de tempo não foi possível isolar o trioxolano IC11, não tendo sido calculado o rendimento da síntese.

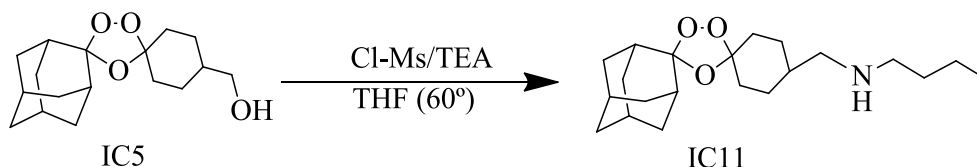


Figura 3-25: Representação da reação de conversão do composto IC5 no composto IC11.

Na Figura 3-26, encontra-se descrita a proposta mecanística de síntese do trioxolano IC11.

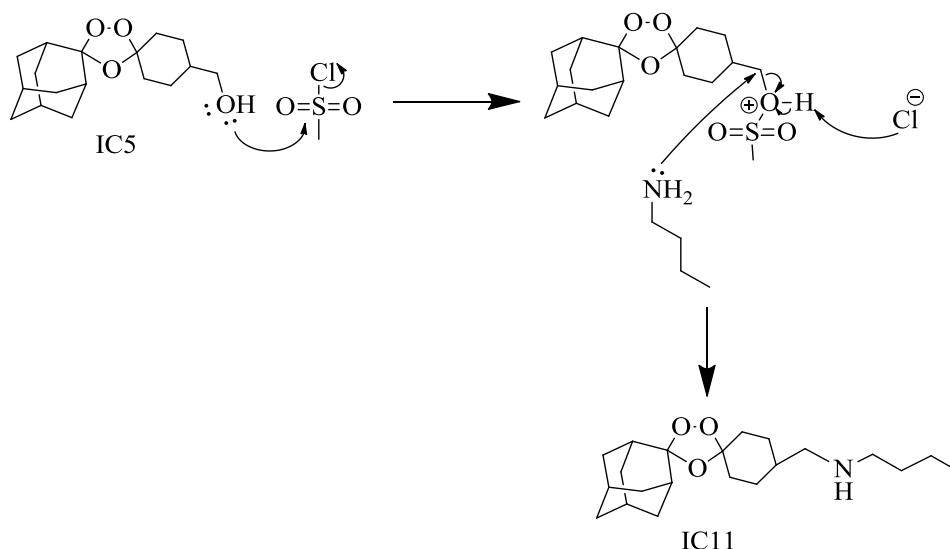


Figura 3-26: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC11.

xi. Síntese do tetraoxano IC1/LC140

O esquema da conversão da adamantanona no tetraoxano IC1 encontra-se ilustrado pela Figura 3-27. Adaptou-se um procedimento de síntese descrito na literatura,²⁰⁸ tendo sido obtido o trioxolano IC1 com um rendimento de 53%.

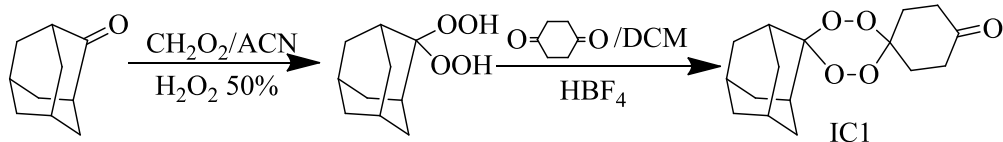


Figura 3-27: Representação da reação de síntese do composto IC1.

A proposta mecanística de síntese do 1,2,4,5-tetraoxano IC1 encontra-se representada na Figura 3-28.

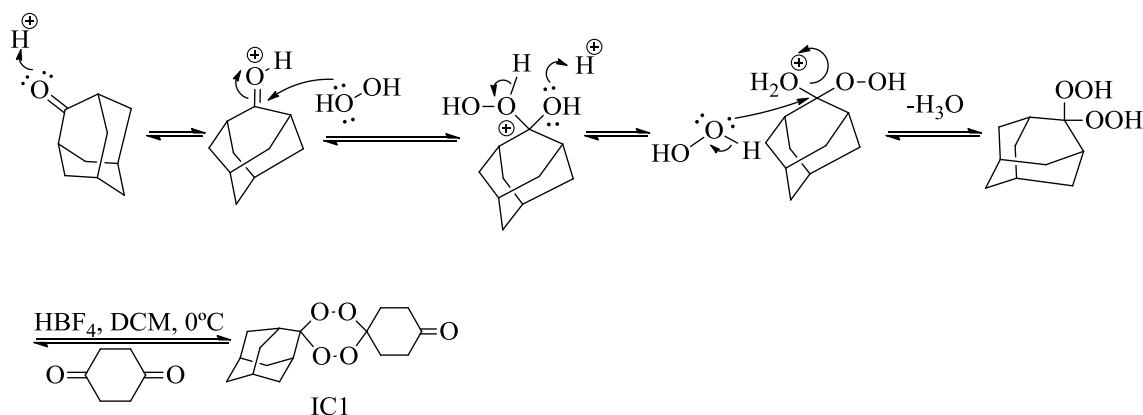


Figura 3-28: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC1.

xii. Síntese do tetraoxano IC12/LC138

O esquema representativo da síntese do composto IC12 encontra-se ilustrado na Figura 3-29. Adaptou-se um procedimento de síntese descrito na literatura,²⁰⁸ tendo sido obtido o trioxolano IC10 com um rendimento de 48%.

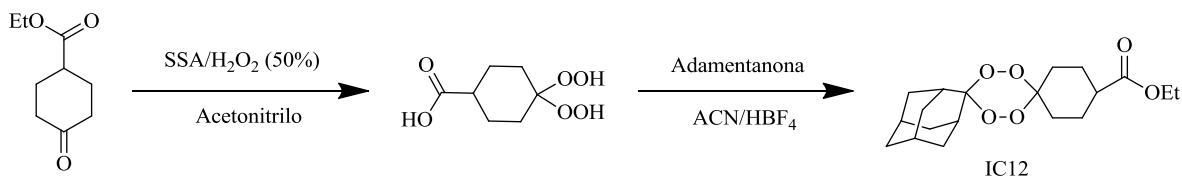


Figura 3-29: Representação da reação de síntese do tetraoxano IC12.

A proposta mecanística de síntese do 1,2,4,5-tetraoxano IC12 encontra-se representada na Figura 3-30.

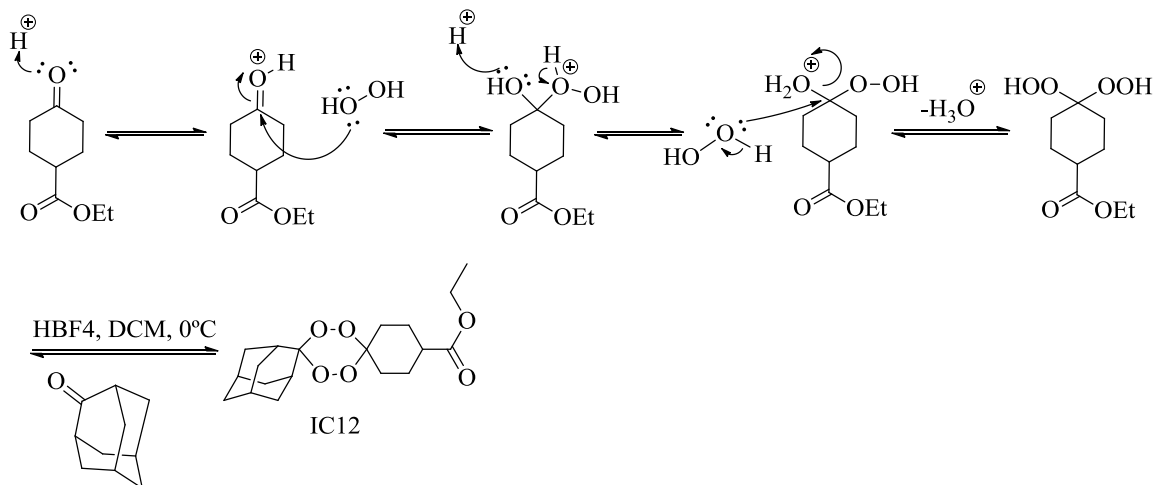


Figura 3-30: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC12.

xiii. Síntese do tetraoxano IC13/LC153

O esquema da síntese do composto IC13 encontra-se ilustrado na Figura 3-31. Adaptou-se um procedimento de síntese descrito na literatura,²⁰⁸ tendo sido obtido o trioxolano IC13 com um rendimento de 38%.

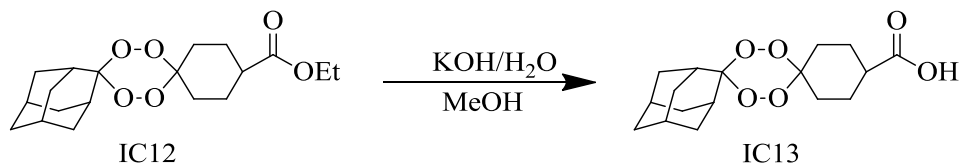


Figura 3-31: Representação da reação de síntese do tetraoxano IC13.

O mecanismo proposto para a formação do ácido carboxílico IC13, encontra-se esquematizado na figura 3-32.

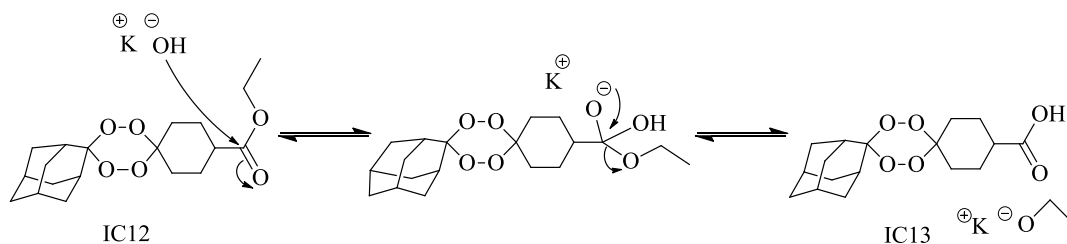


Figura 3-32: Representação da proposta mecanística de síntese do composto IC13.

xiv. Síntese do tetraoxano IC14/LC176

O esquema da conversão do tetraoxano IC13 no composto IC14 está ilustrado na Figura 3-33. Adaptou-se um procedimento de síntese descrito na literatura,²⁰⁸ tendo sido obtido o trioxolano IC14 com um rendimento de 11%.

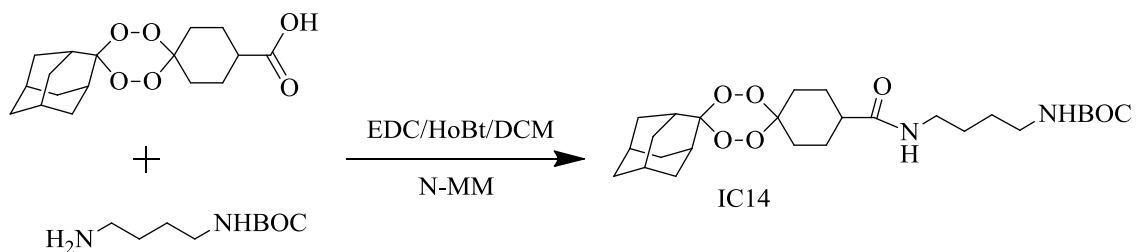


Figura 3-33: Representação da reação de síntese do tetraoxano IC14.

A proposta mecanística é semelhante à apresentada para a síntese do trioxolano IC8, na figura 3-21.

3.7 Parte experimental

3.7.1 Síntese da adamantil-metil-oxima IC2/LC29

Para a obtenção da metil-oxima, adicionou-se à 2-adamantanona (7.011g; 4.67×10^{-2} mol) 50ml de metanol seco, sob agitação. Posteriormente, adicionou-se lentamente piridina (6,66g; $8,4 \times 10^{-2}$ mol) e hidrocloreto de metoxilamina (5g; 5.99×10^{-2} mol). A mistura permaneceu sob agitação, durante 48 horas. Com o intuito de avaliar o progresso da reação, efetuou-se uma TLC (cromatografia em camada fina), utilizando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8).

Quando a análise por TLC revelou o desaparecimento da banda correspondente ao reagente adamantanona, procedeu-se à evaporação do solvente. De seguida dissolveu-se o produto em DCM e lavou-se com água e HCL a 2M para remover a piridina. Para concluir a extração, adicionou-se uma solução aquosa de NaCl cuja função consistiu em aumentar a força iónica em prol da remoção total da piridina. À fração orgânica resultante foi adicionado sulfato de magnésio anidro, para remoção de água, seguindo-se uma filtração. O filtrado foi evaporado obtendo-se a metil-oxima sob a forma de pasta. A

secagem na linha de vácuo, originou um pó amarelo correspondente ao produto desejado (7,90g; $4,41 \times 10^{-2}$ mol; 94%). O seu intervalo de fusão era de 69°-70°C, lit. 70°-71°C¹¹⁵; 1H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 3.82 (s, 3H), 3.43 (s, 1H), 2.51 (s, 1H), 1.97-1.78 (m, 12H) ppm; MS (EI) m/z 180 [M]⁺.

3.7.2 Síntese do trioxolano IC3/LC50

Na preparação da solução, dissolveu-se a adamantil-metiloxima correspondente ao composto IC2 (5.138g; $2,79 \times 10^{-2}$ mol) e 1,4-dioxo-cicloexano (2.50g; $2,23 \times 10^{-2}$ mol) numa mistura de DCM e pentano (1:1) sob agitação, num banho à temperatura ambiente. Após as condições necessárias para se iniciar a reação de ozonólise estarem reunidas, a solução foi adicionada ao fluxo de ozono, durante cerca de 45 minutos. O progresso da reação foi monitorizado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8). Posteriormente, evaporou-se o solvente e utilizando a técnica de cromatografia em coluna purificou-se o produto. O eluente utilizado neste processo consistiu numa mistura de acetato de etilo e hexano numa proporção de 2:8, que posteriormente foi alterada para 1:9. Foram recolhidas duas frações de produto, uma de produto não puro e a outra de produto puro. Por fim, obteve-se um pó branco (2,279g; $1,74 \times 10^{-2}$ mol; 29%) com ponto de fusão de 127-128°C; lit: 126-128°C¹¹⁵ 1H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.5 (t, J=7.0 Hz, 4H), 2.16 (t, J=7.0 Hz, 4H), 1.69-2.14 (m, 14H) ppm; MS (EI) m/z 278.9 [M]⁺.

3.7.3 Síntese do trioxolano IC4/LC67

Dissolveu-se a adamantil-metiloxima, IC2 (12.626g; $7,05 \times 10^{-2}$ mol) e 4-oxociclohexil-etil-éster (9.612g; $5,6 \times 10^{-2}$ mol) numa mistura de DCM e pentano (250ml/250ml) e colocou-se a mistura reacional sob agitação, num banho, à temperatura ambiente. A solução foi submetida a um fluxo de ozono durante cerca de 2 horas e 35 minutos, tal como o descrito para o composto IC3. Monitorizou-se a evolução da reação por TLC, utilizando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (1:9). Posteriormente, evaporou-se o solvente e purificou-se o produto por cromatografia em coluna, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (1:9). O composto IC4 foi obtido na forma óleo viscoso incolor (8,50 g; $2,5 \times 10^{-2}$ mol; 36%).

O trioxolano IC4 foi caracterizado por: ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 4.15 (dd, $J=7.2$ Hz, $J=14.3$ Hz, 2H), 2.33 (m, 1H), 2.03-1.92 (m, 12H), 1.76-1.70 (m, 11H), 1.26 (t, $J=6.9$ Hz, 3H) ppm; MS (EI) m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 359$.

3.7.4 Síntese do trioxolano IC5/LC93

Para se converter a função éster em álcool, adicionou-se tetrahidroborato de lítio (0.45g; 2.08×10^{-2} mol) e o trietil-hidroborato de lítio (0,22 g; 2.08×10^{-3} mol) a uma solução de éster IC4 em éter seco (40ml). A reação realizou-se à temperatura ambiente, sob atmosfera anidra, e sob agitação. Monitorizou-se o progresso da reação por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). Após agitação da mistura reacional durante 4 dias adicionou-se mais éter, para posterior lavagem com NaOH 3 M (duas vezes), água (duas vezes) e solução aquosa saturada de NaCl. A fase orgânica foi extraída e seca com sulfato de magnésio. O filtrado foi evaporado à secura, originando o produto desejado (5,38g; 0,18mol; 88%). Ponto de fusão 99-100°C; lit. 97-99°C. O trioxolano (IC5) foi caracterizado por: ^1H - RMN (400MHz, CDCl_3): δ 3.46 (t, $J=4.8$ Hz, 2H), 2.08-1.51 (m, 21H), 1.25 (m, 2H) ppm; MS (EI) m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 318$.

3.7.5 Síntese do trioxolano IC6/LC68

Dissolveu-se o composto IC4 (2,5g; $7,432 \times 10^{-3}$ mol) num balão sob agitação, a 60°C, ao adicionar-se a mistura de KOH (2.08g) com água (12ml). A reação decorreu durante 24 horas, tendo sido monitorizada por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). Após arrefecimento, adicionou-se HCL concentrado. Sendo a acidificação exotérmica, controlou-se a reação em banho de gelo.

A purificação envolveu uma extração por solventes, lavando a mistura reacional aquosa com DCM (3 vezes). Extraído o composto para a fase orgânica, secou-se com sulfato de magnésio, filtrou-se e evaporou-se o filtrado, obtendo o composto desejado (2,06 g; $6,69 \times 10^{-3}$ mol; 90%). Ponto de fusão: 179-182°C. MS (EI), m/z calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_6$: 324,16; encontrado: 359.33 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$.

3.7.6 Síntese do trioxolano IC7/LC189

Adicionou-se o trioxolano IC5 (1g; $3,399 \times 10^{-3}$ mol), o Cl-Ms (0,43g; $3,74 \times 10^{-3}$ mol) e TEA (0,69g; $6,79 \times 10^{-3}$ mol) a THF (20ml), deixado a mistura sob agitação. Passadas 4 horas, preparou-se uma solução de aminotetrazol (0,53g; $5,1 \times 10^{-3}$ mol) em THF (20ml) que foi adicionada ao balão contendo o álcool já mesilado. A mistura final foi mantida sob agitação a 60°C, durante 24 horas. O progresso da reação foi monitorizado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). Posteriormente secou-se o produto e procedeu-se à purificação do composto desejado por cromatografia em coluna usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7).

3.7.7 Síntese do trioxolano IC8/LC145

O primeiro passo consistiu em adicionar a um balão sob agitação o composto IC6 (1g; $3,24 \times 10^{-3}$ mol), EDC (0,93g; $4,87 \times 10^{-3}$ mol), HOBt (0,65g; $4,87 \times 10^{-3}$ mol), NMM (0,5g; $4,87 \times 10^{-3}$ mol) e DCM (20ml). A mistura reacional permaneceu sob agitação durante 24 horas, após as quais se adicionou a diamina (0,39g; $3,24 \times 10^{-3}$ mol) gota a gota, com o auxílio de uma cânula, mantendo-se a mistura reacional sob agitação por mais 24 horas, e monitorizando por TLC utilizando como eluente uma mistura de metanol e diclorometano (1:9).

Uma vez terminada a reação, procedeu-se à evaporação do solvente e subsequente isolamento do produto a partir do crude por cromatografia em coluna, utilizando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano numa proporção de 2:8. Recolheram-se 2 frações: a primeira correspondente ao composto carboxílico e a segunda correspondente ao produto puro. Deixaram-se estas frações em repouso e cristalizou-se cada fração. Obteve-se um óleo alaranjado (0,44g; $1,17 \times 10^{-3}$ mol; 36%), $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (m, 3H), 1.18 (m, 3H), 1.21 (m, 2H), 1.34 (m, 3H), 2.05 (m, 8H), 2.44 (t, 4H), 3.67 (s, 2H) ppm; m/z 349,18 $[\text{M}]^+$.

3.7.8 Síntese do trioxolano IC9

Dissolveu-se o composto IC6 (1g; $3,24 \times 10^{-3}$ mol), EDC (0,93g; $4,87 \times 10^{-3}$ mol), HOBt (0,65g; $4,87 \times 10^{-3}$ mol) e N-metilmorfolina (0,82g; 8,1mol) em DCM (20ml).

Deixou-se a mistura sob agitação e controlou-se a reação durante cerca de quatro horas, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (5:5), até ao desaparecimento da mancha correspondente ao grupo carboxílico do composto IC6. Adicionou-se a amina (0,92g; $4,87 \times 10^{-3}$ mol) à mistura anterior, gota a gota, com o auxílio de uma cânula. A mistura reacional permaneceu sob agitação durante cerca de 24 horas. Controlou-se a reação por TLC, usando como eluente uma mistura de metanol e DCM (5:5), até ao aparecimento da mancha correspondente ao produto. Evaporou-se o solvente e purificou-se o produto, recorrendo a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando acetato de etilo e hexano (8:2) como mistura de eluição. Obteve-se um sólido amarelo (0,78 g; $1,59 \times 10^{-3}$ mol; 49 %). Ponto de fusão: 110-112°C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 1.19 (s, 9H), 1.34-1.40 (m, 6H), 1.98-2.04 (m, 5H), 2.16-2.20 (m, 5H), 2.28-2.35 (m, 6H), 2.41-2.46 (m, 5H), 2.75 (t, 4H, $J=9.5\text{Hz}$), 4.15 (t, 2H, $J=5.9\text{Hz}$). MS (MALDI-TOF): m/z Calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_7$ 494,30; Encontrado a 519,31 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

3.7.9 Síntese do trioxolano IC10/LC132

A uma solução de IC5 (3,5g; $1,19 \times 10^{-2}$ mol) em THF seco (4ml) sob agitação adicionou-se tert-butóxido de potássio (2,67g; $2,38 \times 10^{-2}$ mol), que funciona como base ao permitir a desprotonação do álcool. O impedimento estéreo impede que o tert-butóxido interfira na reação de substituição. A ativação do álcool realizou-se durante cerca de 24 horas. Posteriormente adiciona-se uma solução de 5-cloro-1-feniltetrazol (3,44g; $1,91 \times 10^{-2}$ mol) em THF (40ml) e colocou-se a mistura reacional em refluxo (60°C).

A reação foi controlada por TLC usando como eluente acetato de etilo e hexano (3:7). De seguida procedeu-se à evaporação do solvente, à extração e à purificação do produto com o auxílio da cromatografia em coluna. Neste processo utilizou-se como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (1:9). O trioxolano IC10 obtido apresenta-se na forma de sólido alaranjado (1,56g; $3,57 \times 10^{-3}$ mol; 30%). O seu intervalo de fusão é de: 82-84°C e foi caracterizado por $^1\text{H -RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.73 (d, 2H, $J=7.7\text{Hz}$), 7.57 (t, 2H, $J=7.7\text{Hz}$), 7.48 (t, 1H, $J=7.3\text{Hz}$), 4.50 (d, 2H, $J=6.5\text{Hz}$), 2.01 (d, 7H, $J=11.3\text{Hz}$), 1.71-1.86 (m, 13H), 1.39-1.46 (m, 2H), 1.27 (s, 1H). ppm; MS (EI) m/z 438 $[\text{M}]^+$.

3.7.10 Síntese do trioxolano IC11/LC188

Num balão adicionou-se o álcool (1g; $3,399 \times 10^{-3}$ mol), Cl-Ms (0,43g; $3,74 \times 10^{-3}$ mol) e TEA (0,69g; $6,798 \times 10^{-3}$ mol) a THF (20ml), deixado a mistura reacional sob agitação. Num outro balão preparou-se uma solução de butilamina (0,37g; $5,098 \times 10^{-3}$ mol) em THF (20ml) e passadas 2 horas esta mistura foi adicionada à mistura anterior, mantendo a mistura final sob agitação, a 60°C, durante 24h. O percurso da reação foi monitorizado por TLC, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (3:7). Posteriormente evaporou-se o solvente, procedendo-se à purificação do composto por cromatografia em coluna usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8).

3.7.11 Síntese do tetraoxano IC1/LC140

A síntese do tetraoxano envolveu uma sequência de dois passos. Em primeiro lugar fez-se reagir a adamantanona (2g; $1,33 \times 10^{-2}$ mol) com peróxido de hidrogénio a 50% (8ml; 0,28mol) e ácido fórmico (14,8g; 0,39mol), em 22ml de acetonitrilo, a 0°C. A oxidação do grupo carbonílico ocorre por ação de peróxido de hidrogénio e a formação do composto intermediário foi comprovada por TLC, utilizando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8). Ao dihidroperóxido, foi adicionada uma mistura que continha ciclohexadiona (1,5g; $1,33 \times 10^{-2}$ mol) e ácido fluorobórico (1,82ml; $1,3 \times 10^{-2}$ mol) em 40 ml de diclorometano, prosseguindo a ciclização para formação do trioxolano. Monitorizou-se a formação do produto desejado por TLC, utilizando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano (2:8). Após a evaporação do solvente, isolou-se o produto por cromatografia em coluna, utilizando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano numa proporção de (1:9).

Foi obtido um sólido com (2,1g; $7,05 \times 10^{-3}$ mol; 53%). Ponto de fusão: 156-158°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.67 (s, 5H), 1.85-2.04 (m, 14H), 3.01 (t, 3H, J=5.8Hz). MS (MALDI-TOF): m/z calculado para C₁₆H₂₂O₅: 294,15; encontrado: 318,28 [M+Na]⁺.

3.7.12 Síntese do tetraoxano IC12/LC138

À semelhança do procedimento acima descrito, a obtenção do tetraoxano IC12 também envolveu a realização de duas etapas. Na primeira fase, fez-se reagir o cicloéster (1g; $5,87 \times 10^{-3}$ mol), com 5,87ml de H₂O₂ a 50% e SSA (0,587g), em ACN (23,5ml), a 0°C. Manteve-se a reação sob agitação durante 24 horas tendo se verificado a formação do dihidroperóxido por TLC (acetato de etilo/hexano; 3:7). Posteriormente, adicionou-se ao intermediário formado, uma mistura de adamantanona, ACN e HBF₄ em DCM. Foi realizada uma TLC que demonstrou ainda existir cicloéster por reagir, tendo sido adicionado à reação 0,3g de sílica. Após o completo consumo do ciclo éster, procedeu-se à filtração, à extração e por fim realizou-se uma cromatografia em coluna para purificar o composto, usando como eluente uma mistura de acetato de etilo e hexano numa proporção de (2:8). Obteve-se uma fração de produto desejado na forma de pó branco (0,327g; $2,84 \times 10^{-3}$ mol; 48%). Ponto de fusão: 74-75°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.25 (s, 3H), 1.74-2.11 (m, 21H), 3.08 (t, 2H, J=5.8Hz), 4.48 (m, 2H). MS (MALDI-TOF): m/z [M⁺] calculado para C₁₉H₂₈O₆: 352,19; encontrado: 393,47 [M+K]⁺.

3.7.13 Síntese do tetraoxano IC13/LC153

Dissolveu-se o composto IC12 (0,327g; $2,84 \times 10^{-3}$ mol) em MeOH (10ml) num balão que permaneceu sob agitação, a 60°C. A reação decorreu durante 24h tendo sido monitorizada por TLC, (acetato de etilo/hexano; 3:7). Posteriormente adicionou-se à reação a mistura de KOH (0,21g; $1,13 \times 10^{-3}$ mol) em água (1,1ml). Adicionou-se também HCL concentrado à temperatura ambiente para que a mistura fosse acidificada de forma a protonar o sal formado.

Para purificar o produto procedeu-se à extração por solventes, lavando a mistura reacional aquosa com DCM (3 vezes). Extraído o composto para a fase orgânica, secou-se com sulfato de magnésio, filtrou-se e evaporou-se o filtrado, obtendo o produto desejado (0,334g; $1,08 \times 10^{-3}$ mol; 38%). Ponto de fusão: 179-182°C. MS (EI), m/z calculado para C₁₇H₂₄O₆: 324,16; encontrado: 359.33 [M+Cl]⁻.

3.7.14 Síntese do tetraoxano IC14/LC176

Dissolveu-se o composto IC13 (0,334g; $1,08 \times 10^{-3}$ mol), EDC (0,33g; $1,62 \times 10^{-3}$ mol), HOBt (0,23g; $1,62 \times 10^{-3}$ mol) e N-metilmorfolina (0,12g; $1,62 \times 10^{-3}$ mol) em DCM (15ml), à temperatura ambiente. Deixou-se a mistura sob agitação e controlou-se a reação por TLC durante cerca de três horas, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3), até ao desaparecimento da mancha correspondente ao tetraoxano IC13. Adicionou-se a amina (0,30g; $1,62 \times 10^{-3}$ mol) à mistura anterior, gota a gota com o auxílio de uma cânula. A mistura reacional permaneceu sob agitação durante cerca de 24 horas. Controlou-se a reação por TLC, usando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etilo (7:3), até ao aparecimento da mancha correspondente ao produto. Evaporou-se o solvente e purificou-se o produto, recorrendo-se a uma cromatografia em coluna de sílica gel, usando hexano e acetato de etilo (7:3) como mistura de eluição. Obteve-se um óleo (0,05g; $1,19 \times 10^{-4}$ mol; 11%). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 1.33 (s, 16H), 1.49-1.98 (m, 13H), 2.07 (s, 2H, $J=5.8\text{Hz}$), 2.94 (t, 2H, $J=7.2\text{Hz}$), 3.10 (t, 2H, $J=9.6\text{Hz}$), 3.27 (m, 1H). MS (MALDI-TOF): m/z calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_6$: 466,30; encontrado: 502,45 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$.

4 Conclusão

A toxoplasmose atinge mais de 2 milhões de pessoas na região Europeia, sendo atualmente considerada uma infecção parasitária negligenciada. Existem várias vias que favorecem a contaminação do ser humano estando incluída a prática deficiente de hábitos de higiene, associada a populações com menor estatuto socioeconómico e menor acesso à educação. Estas circunstâncias, relacionam-se maioritariamente com países em desenvolvimento, os locais onde são atingidas elevadas taxas de infeção.

O arsenal terapêutico atualmente em vigor evidencia fragilidades, incluindo toxicidade e eficácia reduzida, sendo esta essencialmente devida ao desenvolvimento de resistências. Estas fragilidades são agravadas pela necessidade de tratamentos prolongados, podendo conduzir a recrudescência da infeção. O desenvolvimento de novos fármacos para tratamento da toxoplasmose apresenta inúmeros desafios importantes para a sociedade, particularmente no que se refere à segurança na gravidez. Adicionalmente, as novas formulações devem ser baratas e fáceis de utilizar, favorecendo a adesão à terapêutica nas diversas áreas pobres do mundo.

Os conhecimentos de parasitologia acumulados indicam que tanto o *Plasmodium spp.* como o *T. gondii* pertencem ao mesmo filo Apicomplexa, partilhando vias metabólicas. Estas semelhanças explicam a suscetibilidade de ambas as espécies a fármacos de quimiotipos idênticos. Com o aumento da investigação para a descoberta de novas formas de quimioterapia que colmatem as necessidades do tratamento contra a toxoplasmose, foram identificadas novas hipóteses de candidatos a fármacos. Os endoperóxidos são exemplos de fármacos que apresentam atividade contra estes parasitas tendo sido estabelecido que atuam essencialmente interferindo na homeostase do cálcio. Esta classe molecular tem demonstrado resultados promissores, promovendo um acumular de expectativas quanto ao seu uso no combate de doenças parasitárias. Este trabalho tem como objetivo futuro enviar os compostos preparados para ensaios *in vitro* em *T. gondii*. Os resultados darão indicações para otimização estrutural e posterior seleção de 2-3 moléculas *in vivo*. O objetivo último é aumentar o leque de fármacos e também o desenvolver de otimizações dos existentes, colmatando as lacunas atuais na quimioterapia da toxoplasmose. Na área de química medicinal, a persistência e experiência no domínio da síntese orgânica são cruciais para o sucesso da investigação. Este trabalho proporcionou à autora a aquisição de novos conhecimentos neste âmbito.

5 Referências bibliográficas

1. Sullivan, W. J. & Jeffers, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 717–733 (2012). doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00305.x.
2. Costa, J. G. & Vilariño, M. J. Semiquantitative Dot Blot with the GRA8 antigen to differentiate the stages of toxoplasmosis infection. *J. Microbiol. Methods* **149**, 9–13 (2018). doi:10.1016/J.MIMET.2018.04.015
3. Dubey, J. P. History and life cycle of *Toxoplasma Gondii* in *Toxoplasma gondii: The Model Apicomplexan, Perspectives and Methods*. 1-17 (Academic Press, 2007).
4. Gunn, A., Pitt S. Parasitology: An integrated approach. 54-58 (John Wiley & Sons, 2012).
5. Centers for Disease Control and Prevention. CDC - Toxoplasmosis. Available at: <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/>. (Accessed: 26th June 2018)
6. Pittman, K. J. & Knoll, L. J. Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* during Acute and Chronic Infections. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **79**, 387–401 (2015). doi:10.1128/MMBR.00027-15
7. Innes, E. A. A Brief History and Overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses Public Health* **57**, 1–7 (2010). doi:10.1111/j.1863-2378.2009.01276.x
8. Dubey, J. P. The History of *Toxoplasma gondii*—The First 100 Years. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **55**, 467-475 (2008). doi:10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x
9. Kim, K. & Weiss, L. M. *Toxoplasma*: the next 100years. *Microbes Infect.* **10**, 978–84 (2008). doi:10.1016/j.micinf.2008.07.015.
10. Sabin, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **116**, 801-807 (1941). doi:10.1001 / jama.1941.0282009000100
11. Weiss, L. M. & Dubey, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int. J. Parasitol.* **39**, 895–901 (2009). doi:10.1016/j.ijpara.2009.02.004
12. Wolf, A., Cowen, D. & Paige, B. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science (80)*. **89**, 226–227 (1939). doi:10.1126/science.89.2306.226
13. Sabin, A. B. & Warren, J. Therapeutic Effectiveness of Certain Sulfonamides on Infection by an Intracellular Protozoon (*Toxoplasma*). *Exp. Biol. Med.* **51**, 19–23 (1942). doi:10.3181/00379727-51-13809
14. Feldman, H. A. & Miller, L. T. Serological study of toxoplasmosis prevalence. *Am. J. Epidemiol.* **64**, 320–335 (1956). doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a119845
15. Reiter-Owona, I. *et al.* The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bull. World Health Organ.* **77**, 929–35 (1999).
16. Fulton, J. D. Micro-agglutination Test for *Toxoplasma* Antibodies. *Immunology* **9**, 491-495, (1965).

17. Remington, J. S., Miller, M. J. & Brownlee, I. IgM antibodies in acute toxoplasmosis: I. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. *Pediatrics* **41**, 1082-1091 (1968).
18. Dubey, J. P., Miller, N. L. & Frenkel, J. K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J. Exp. Med.* **132**, 636–62 (1970). doi:10.1084 / jem.132.4.636
19. Dubey, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, **39**, 877-882 (2009). doi:10.1016/j.ijpara.2009.01.005
20. Mazzillo, F. F. M., Shapiro, K. & Silver, M. W. A new pathogen transmission mechanism in the ocean: the case of sea otter exposure to the land-parasite *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* **8**, e82477 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0082477
21. Desmonts, G. & Couvreur, J. Congenital Toxoplasmosis. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1110–1116 (1974). doi:10.1056/NEJM197405162902003
22. Snider, W. D. *et al.* Neurological complications of acquired immune deficiency syndrome: Analysis of 50 patients. *Ann. Neurol.* **14**, 403–418 (1983). doi:10.1002/ana.410140404
23. Burg, J. L., Grover, C. M., Pouletty, P. & Boothroyd, J. C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1787–92 (1989).
24. Engstrom, R. E., Holland, G. N., Nussenblatt, R. B. & Jabs, D. A. Current Practices in the Management of Ocular Toxoplasmosis. *Am. J. Ophthalmol.* **111**, 601–610 (1991). doi:10.1016/S0002-9394(14)73706-7
25. Furtado, J. M. *et al.* Toxoplasmosis: a global threat. *J. Glob. Infect. Dis.* **3**, 281–284 (2011). doi:10.4103/0974-777X.83536
26. Jones, J. L., Kruszon-Moran, D., Sanders-Lewis, K. & Wilson, M. *Toxoplasma gondii* Infection in the United States, 1999–2004, Decline from the Prior Decade. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**, 405–410 (2007). doi:10.4269/ajtmh.2007.77.405
27. Pappas, G., Roussos, N. & Falagas, M. E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* **39**, 1385–1394 (2009). doi:10.1016/J.IJPARA.2009.04.003
28. Robert-Gangneux, F. & Dardé, M.-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 264–96 (2012). doi:10.1128/CMR.05013-11
29. Flegr, J., Prandota, J., Sovičková, M. & Israili, Z. H. Toxoplasmosis – A Global Threat. Correlation of Latent Toxoplasmosis with Specific Disease Burden in a Set of 88 Countries. *PLoS One* **9**, e90203 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0090203
30. Kijlstra, A. & Jongert, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int. J. Parasitol.* **38**, 1359–1370 (2008). doi:10.1016/j.ijpara.2008.06.002
31. European Centre for Disease Prevention and Control. Congenital toxoplasmosis - Annual Epidemiological Report 2016. Available at:

- <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/congenital-toxoplasmosis-annual-epidemiological-report-2016>. (Accessed: 1st July 2019)
32. Dubey, J. P., Lago, E. G., Gennari, S. M., Su, C. & Jones, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* **139**, 1375–1424 (2012). doi:10.1017/S0031182012000765
 33. Jones, J. L. & Holland, G. N. Annual burden of ocular toxoplasmosis in the US. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**, 464–5 (2010). doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0664
 34. Barbara Clough and Eva-Maria Frickel. The Toxoplasma Parasitophorous Vacuole: An Evolving Host-Parasite Frontier. *Trends in Parasitology* **33**, 473-488, (2017). doi:10.1016/j.pt.2017.02.007
 35. Hu, K. *et al.* Cytoskeletal Components of an Invasion Machine—The Apical Complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* **2**, e13 (2006). doi:10.1371/journal.ppat.0020013
 36. Tenter, A. M., Heckeroth, A. R. & Weiss, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* **30**, 1217–1258 (2000). doi:10.1016/S0020-7519(00)00124-7
 37. Kochanowsky, J. A. & Koshy, A. A. *Toxoplasma gondii*. *Curr. Biol.* **28**, R770–R771 (2018). doi:10.1016/j.cub.2018.05.035
 38. Black, M. W. & Boothroyd, J. C. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 607–623 (2000). doi:10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000
 39. Neves, D., Melo, A., Linardi, P., Vitor. R. *Parasitologia Humana*. 163-172 (Atheneu, 2005).
 40. Hill, D. & Dubey, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**, 634–640 (2002). doi:10.1046/J.1469-0691.2002.00485.X
 41. Paniker, C., Ghosh, S. Paniker’s Textbook of Medical Parasitology. 87-93 (Jaypee Brothers Medical, 2013).
 42. Rosenthal, P. J. Book Review: Parasitic Diseases, 6th Edition. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **98**, 933–934 (2018). doi:10.4269/ajtmh.17-1003
 43. Nissapatorn, V., Lau, Y. L. & Fong, M. Y. *Toxoplasma gondii*: The Parasite in Trend. in *Parasites and their vectors: A special focus on Southeast Asia*. 155–175 (Springer, 2013). doi:10.1007/978-3-7091-1553-4_8
 44. Yan, C., Liang, L.-J., Zheng, K.-Y. & Zhu, X.-Q. Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. *Parasit. Vectors* **9**, 137 (2016). doi:10.1186 / s13071-016-1432-6
 45. Karanis, P., Aldeyarbi, H. M., Mirhashemi, M. E. & Khalil, K. M. The impact of the waterborne transmission of *Toxoplasma gondii* and analysis efforts for water detection: an overview and update. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **20**, 86–99 (2013). doi:10.1007 / s11356-012-1177-5
 46. Montoya, J. & Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *Lancet* **363**, 1965–1976 (2004). doi:10.1016/S0140-6736(04)16412-X

47. Singh, S., Munawwar, A., Rao, S., Mehta, S. & Hazarika, N. K. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in Indian women of child bearing age and effects of social and environmental factors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e2737 (2014). doi:10.1371/journal.pntd.0002737
48. McAuley, J. B. Congenital Toxoplasmosis. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* **3 Suppl 1**, S30-5 (2014). doi:10.1093/jpids/piu077
49. National Health Service. Toxoplasmosis (6 March 2019). Available at: <https://www.nhs.uk/conditions/toxoplasmosis/>. (Accessed: 6th March 2019)
50. Hampton, M. M. Congenital Toxoplasmosis: A Review, *Neonatal Network*, **34**, 274-278 (2015). doi:10.1891/0730-0832.34.5.274
51. Singh, S. Congenital toxoplasmosis: Clinical features, outcomes, treatment, and prevention. *Trop. Parasitol.* **6**, 113–122 (2016). doi:10.4103/2229-5070.190813
52. Birth Defect Research for Children. Toxoplasmosis During Pregnancy - Prevention (6 March 2019). Available at: <https://www.birthdefects.org/healthy-baby/maternal-illness/toxoplasmosis/>. (Accessed: 6th March 2019)
53. Park, Y.-H. & Nam, H.-W. Clinical features and treatment of ocular toxoplasmosis. *Korean J. Parasitol.* **51**, 393–9 (2013). doi:10.3347/kjp.2013.51.4.393
54. Braakenburg, A. & Rothova, A. Advances in Ocular Toxoplasmosis. in *Uveitis: An Update*. 1–7 (Springer, 2016). doi:10.1007/978-81-322-2295-8_1
55. Saadatnia, G. & Golkar, M. A review on human toxoplasmosis. *Scand. J. Infect. Dis.* **44**, 805–814 (2012). doi:10.3109/00365548.2012.693197
56. Magliyah, M. S. A. & Al-Khars, W. I. Ocular toxoplasmosis related macular traction: A case report and review of the literature. *Saudi J. Ophthalmol.*, **33**, 84-87 (2019). doi:10.1016/J.SJOPT.2018.07.002
57. Lisboa, M. *et al.* Toxoplasmose Ocular Primária. *Rev. da Soc. Port. Oftalmol.* **37**, 133–138 (2013).
58. Atmaca, L. S., Simsek, T. & Batioglu, F. Clinical Features and Prognosis in Ocular Toxoplasmosis. *Jpn. J. Ophthalmol.* **48**, 386–391 (2004). doi:10.1007/s10384-003-0069-0
59. Zegans Michael, T. K. Management of Ocular Toxoplasmosis - American Academy of Ophthalmology. Available at: <https://www.aao.org/current-insight/management-of-ocular-toxoplasmosis>. (Accessed: 10th March 2019)
60. Buzoni-Gatel, D. & Kasper, L. H. Innate Immunity in *Toxoplasma gondii* Infection. in *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan, Perspectives and Methods*. 593–607 (Academic Press, 2007). doi:10.1016/B978-012369542-0/50024-6
61. Villard, O. *et al.* Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **84**, 22–33 (2016). doi:10.1016/J.DIAGMICROBIO.2015.09.009
62. Lycke, E. & Norrby, R. Demonstration of a factor of *Toxoplasma Gondii* enhancing the penetration of *Toxoplasma* parasites into cultured host cells. *Br. J.*

- Exp. Pathol.* **47**, 248-256 (1966)
63. Cordeiro, C. A. *et al.* Immunology of the toxoplasmic retinochoroiditis. *Arq. Bras. Oftalmol.* **73**, 548–551 (2010). doi:10.1590/S0004-27492010000600018
64. Denkers, E. Y. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **39**, 193–203 (2003). doi:10.1016/S0928-8244(03)00279-7
65. Tizard, I. R. *Veterinary immunology*. 312-316 (Saunders/Elsevier, 2013).
66. Buzoni-Gatel, D. & Werts, C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. *Trends Parasitol.* **22**, 448–452 (2006). doi:10.1016/J.PT.2006.08.002
67. Peterson, P. K., Gekker, G., Hu, S. & Chao, C. C. Human Astrocytes Inhibit Intracellular Multiplication of *Toxoplasma gondii*; by a Nitric Oxide-Mediated Mechanism. *The Journal of Infectious Diseases* **171**, 516–518 (1995) doi:10.2307/30132064
68. Tedford, E. & McConkey, G. Neurophysiological Changes Induced by Chronic *Toxoplasma gondii* Infection. *Pathog.* **6**, 19 (2017). doi:10.3390/pathogens6020019
69. Lieberman, L. A. & Hunter, C. A. The role of cytokines and their signaling pathways in the regulation of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Int. Rev. Immunol.* **21**, 373–403 (2002). doi:10.1080/08830180213281
70. Khan, K. & Khan, W. Congenital toxoplasmosis: An overview of the neurological and ocular manifestations. *Parasitol. Int.* **67**, 715–721 (2018). doi:10.1016/J.PARINT.2018.07.004
71. Zhang, K., Lin, G., Han, Y. & Li, J. Serological diagnosis of toxoplasmosis and standardization. *Clin. Chim. Acta* **461**, 83–89 (2016). doi:10.1016/J.CCA.2016.07.018
72. Dard, C., Fricker-Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M.-P. & Pelloux, H. Relevance of and New Developments in Serology for Toxoplasmosis. *Trends Parasitol.* **32**, 492–506 (2016). doi:10.1016/j.pt.2016.04.001
73. Remington, J. S., Thulliez, P. & Montoya, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 941–5 (2004). doi:10.1128/JCM.42.3.941-945.2004
74. Martin, B. L. Toxoplasmosis: A Comprehensive Clinical Guide. *Obstet. Gynaecol.* **6**, 187–187 (2004). doi:10.1576/toag.6.3.187.27008
75. Murat, J.-B., Fricker Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M.-P. & Pelloux, H. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **11**, 943–956 (2013). doi:10.1586/14787210.2013.825441
76. Tabile, P. M. *et al.* Toxoplasmosis Gestational: a review of the literature. *Rev. Epidemiol. Control Infect.* **5**, 158-162 (2015) doi:10.17058/reci.v5i3.5178
77. Foulon, W. *et al.* Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: A multicenter evaluation of different diagnostic parameters. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **181**, 843–847 (1999). doi:10.1016/S0002-9378(99)70311-X

78. Bastien, P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **96 Suppl 1**, S205-15 (2002). doi:10.1016 / s0035-9203 (02) 90078-7
79. Oz, H. S. Maternal and congenital toxoplasmosis, currently available and novel therapies in horizon. *Front. Microbiol.* **5**, 385 (2014). doi:10.3389/fmicb.2014.00385
80. Vidal, J. E., Colombo, F. A., Penalva de Oliveira, A. C., Focaccia, R. & Pereira-Chioccola, V. L. PCR Assay Using Cerebrospinal Fluid for Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4765–4768 (2004). doi:10.1128/JCM.42.10.4765-4768.2004
81. Melino Pessanha, T., De Carvalho, M., Vinícius, M., Pone, S. & Gomes Júnior, C. Diagnostic and therapeutic management of toxoplasmosis in pregnancy and the effect in the newborn. *Rev Paul Pediatr.* **29**, 341-347 (2011). doi:10.1590/S0103-05822011000300006
82. Derouin, F., Mazon, M. C. & Garin, Y. J. Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 1597–600 (1987).
83. Kompalic-Cristo, A., Britto, C. & Fernandes, O. Molecular diagnosis of toxoplasmosis: review. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* **41**, 229-235 (2005) doi:10.1590/S1676-24442005000400003
84. Lambooi, M. S. *et al.* Consumers' preferences for freezing of meat to prevent toxoplasmosis– A stated preference approach. *Meat Sci.* **149**, 1–8 (2019). doi:10.1016/J.MEATSCI.2018.11.001
85. Elmore, S. A. *et al.* *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol.* **26**, 190–196 (2010). doi:10.1016/j.pt.2010.01.009
86. Maldonado, Y. A. & Read, J. S. Diagnosis, Treatment, and Prevention of Congenital Toxoplasmosis in the United States. *Am. Acad. Pediatr.* **139**, e20163860 (2017). doi:10.1542/peds.2016-3860
87. Jones, J. L. & Dubey, J. P. Foodborne Toxoplasmosis. *Clin. Infect. Dis.* **55**, 845–851 (2012). doi:10.1093/cid/cis508
88. Djurković-Djaković, O., Dupouy-Camet, J., Van der Giessen, J. & Dubey, J. P. Toxoplasmosis: Overview from a One Health perspective. *Food Waterborne Parasitol.* **15**, e00054 (2019). doi:10.1016/J.FAWPAR.2019.E00054
89. Frenkel, J. K. & Dubey, J. P. Toxoplasmosis and Its Prevention in Cats and Man. *J. Infect. Dis.* **126**, 664–673 (1972). doi:10.1093/infdis/126.6.664
90. Boaz, M. R., Bordignon, S. & Nesralla, I. A. The importance of preventive measures in the prophylaxis of infections in patients submitted to heart transplant during the first thirty postsoperative days. *Braz J Cardiovasc Surg.* **21**, 188-193 (2006). doi:10.1590/S0102-76382006000200012
91. Derouin, F. & Pelloux, H. Prevention of toxoplasmosis in transplant patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 1089–1101 (2008). doi:10.1111/J.1469-0691.2008.02091.X
92. McCabe, R. E. & Oster, S. Current Recommendations and Future Prospects in the Treatment of Toxoplasmosis. *Drugs* **38**, 973–987 (1989). doi:10.2165/00003495-

198938060-00008

93. Alday, P. H. & Doggett, J. S. Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. *Drug Des. Devel. Ther.* **11**, 273–293 (2017). doi:10.2147/DDDT.S60973
94. Rajapakse, S., Chrishan Shivanthan, M., Samaranayake, N., Rodrigo, C. & Deepika Fernando, S. Antibiotics for human toxoplasmosis: a systematic review of randomized trials. *Pathog. Glob. Health* **107**, 162–9 (2013). doi:10.1179/2047773213Y.0000000094
95. Coombs, G. & Müller, S. Recent advances in the search for new anti-coccidial drugs. *Int. J. Parasitol.* **32**, 497–508 (2002). doi:10.1016/S0020-7519(01)00354-X
96. Welsch, M. E. *et al.* Discovery of Potent and Selective Leads against *Toxoplasma gondii* Dihydrofolate Reductase via Structure-Based Design. *ACS Med. Chem. Lett.* **7**, 1124–1129 (2016). doi:10.1021/acsmchemlett.6b00328
97. Radke, J. B., Burrows, J. N., Goldberg, D. E. & Sibley, L. D. Evaluation of Current and Emerging Antimalarial Medicines for Inhibition of *Toxoplasma gondii* Growth in Vitro. *ACS Infect. Dis.* **4**, 1264–1274 (2018). doi:10.1021/acsinfecdis.8b00113
98. Van der Ven, A. J. A. M. *et al.* Anti-toxoplasma effect of pyrimethamine, trimethoprim and sulphonamides alone and in combination: implications for therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**, 75–80 (1996). doi:10.1093/jac/38.1.75
99. Mzabi, A., Aubert, D. & Villena, I. Mechanisms of Drug Resistance in *Toxoplasma gondii*. in *Antimicrobial Drug Resistance* 677–684 (Springer, 2017). doi:10.1007/978-3-319-46718-4_44
100. Many, A. & Koren, G. Toxoplasmosis during pregnancy. *Can. Fam. Physician* **52**, 29–32 (2006).
101. Organização Mundial de Saúde. Informações sobre Prescrição de Medicamentos utilizados nas Doenças Parasitárias - Segunda Edição: Protozoários: Toxoplasmose: Pirimetamina. Available at: <https://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2922e/2.8.1.html>. (Accessed: 9th June 2019)
102. Peters, P. J., Thigpen, M. C., Parise, M. E. & Newman, R. D. Safety and Toxicity of Sulfadoxine/Pyrimethamine. *Drug Saf.* **30**, 481–501 (2007). doi:10.2165/00002018-200730060-00003
103. Ben-Harari, R. R., Goodwin, E. & Casoy, J. Adverse Event Profile of Pyrimethamine-Based Therapy in Toxoplasmosis: A Systematic Review. *Drugs R. D.* **17**, 523 (2017). doi:10.1007/S40268-017-0206-8
104. Petersen, E., Ajzenberg, D., Mandelbrot, L. & Gomez-Marin, J. E. Protozoan Diseases: Toxoplasmosis. in *International Encyclopedia of Public Health* 114–132 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-803678-5.00361-1
105. Tabatabaei, I. *et al.* A highly efficient sulfadiazine selection system for the generation of transgenic plants and algae. *Plant Biotechnol. J.* **17**, 638–649 (2019). doi:10.1111/pbi.13004

106. Scholar, E. Sulfonamides. in *xPharm Compr. Pharmacol. Ref.* 1–4 (Elsevier, 2008). doi:10.1016/B978-008055232-3.61013-X
107. Mandelbrot, L. *et al.* Prenatal therapy with pyrimethamine + sulfadiazine vs spiramycin to reduce placental transmission of toxoplasmosis: a multicenter, randomized trial. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **219**, 386.e1-386.e9 (2018). doi:10.1016/J.AJOG.2018.05.031
108. Kaye, A. Toxoplasmosis: Diagnosis, Treatment, and Prevention in Congenitally Exposed Infants. *J. Pediatr. Heal. Care* **25**, 355–364 (2011). doi:10.1016/j.pedhc.2010.04.008
109. Serranti, D., Buonsenso D. & Valentini, P. Congenital Toxoplasmosis treatment. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **15**, 193-198 (2011).
110. Petersen, E. & Schmidt, D. R. Sulfadiazine and pyrimethamine in the postnatal treatment of congenital toxoplasmosis: what are the options? *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **1**, 175–182 (2003). doi:10.1586/14787210.1.1.175
111. Hitchings, G. H. Mechanism of Action of Trimethoprim-Sulfamethoxazole--I. *J. Infect. Dis.* **128**, S433–S436 (1973). doi:10.1093/infdis/128.Supplement_3.S433
112. Coppens, I. Exploitation of auxotrophies and metabolic defects in *Toxoplasma* as therapeutic approaches. *Int. J. Parasitol.* **44**, 109–120 (2014). doi:10.1016/J.IJPARA.2013.09.003
113. Kuhlmann, F. M. & Fleckenstein, J. M. Antiparasitic Agents. in *Infectious Diseases.* 1345–1372.e2 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-7020-6285-8.00157-X
114. Ho, J. M.-W. & Juurlink, D. N. Considerations when prescribing trimethoprim-sulfamethoxazole. *CMAJ* **183**, 1851–8 (2011). doi:10.1503/cmaj.111152
115. Smieja, M. Current indications for the use of clindamycin: A critical review. *Can. J. Infect. Dis.* **9**, 22–8 (1998). doi:10.1155 / 1998/538090
116. Blais, J., Tardif, C. & Chamberland, S. Effect of Clindamycin on Intracellular Replication, Protein Synthesis, and Infectivity of *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 2571-2577 (1993). doi:10.1128/aac.37.12.2571
117. Rolston, K. V. I. & Hoy, J. Role of clindamycin in the treatment of central nervous system toxoplasmosis. *Am. J. Med.* **83**, 551–554 (1987). doi:10.1016/0002-9343(87)90769-8
118. Madi, D., Achappa, B., Rao, S., Ramapuram, J. T. & Mahalingam, S. Successful treatment of cerebral toxoplasmosis with clindamycin: a case report. *Oman Med. J.* **27**, 411–412 (2012). doi:10.5001/omj.2012.100
119. Soheilian, M. *et al.* Randomized Trial of Intravitreal Clindamycin and Dexamethasone versus Pyrimethamine, Sulfadiazine, and Prednisolone in Treatment of Ocular Toxoplasmosis. *American Academy of Ophthalmology* **118**, 134-141 (2011). doi:10.1016/j.opthta.2010.04.020
120. Araujo, F. G. & Remington, J. S. Effect of Clindamycin on Acute and Chronic Toxoplasmosis in Mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **5**, 647-651 (1974).

doi:10.1128 / AAC.5.6.647

121. Bryskier, A. Macrolides. in *Antibiotic and Chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy*. 276–289 (Elsevier, 2010). doi:10.1016/B978-0-7020-4064-1.00022-1
122. Descotes, J., Vial, T., Delattre, D. & Evreux, J.-C. Spiramycin: safety in man. *J. Antimicrob. Chemother.* **22**, 207–210 (1988). doi:10.1093/jac/22.Supplement_B.207
123. Kovoov, P. A., Karim, S. M. & Marshall, J. L. Is Levoleucovorin an Alternative to Racemic Leucovorin? A Literature Review. *Clin. Colorectal Cancer* **8**, 200–206 (2009). doi:10.3816/CCC.2009.n.034
124. Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (Infarmed) Folheto informativo: Informação para o utilizador. Medifolin. (2018). Available at: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=5379&tipo_documento=f
125. Van Delden, C. & Hirschel, B. Folinic Acid Supplements to Pyrimethamine-Sulfadiazine for Toxoplasma Encephalitis Are Associated with Better Outcome. *J. Infect. Dis.* **173**, 1294–1295 (1996). doi:10.1093/infdis/173.5.1294
126. Damaske, A., Ma, N. & Williams, R. Leucovorin-induced hypersensitivity reaction. *J. Oncol. Pharm. Pract.* **18**, 136–139 (2012). doi:10.1177/1078155210396577
127. Kovacs, J. Efficacy of atovaquone in treatment of toxoplasmosis in patients with AIDS. *Lancet* **340**, 637–638 (1992). doi:10.1016/0140-6736(92)92172-C
128. Oz, H. S. Toxoplasmosis complications and novel therapeutic synergism combination of diclazuril plus atovaquone. *Front. Microbiol.* **5**, 484 (2014). doi:10.3389/fmicb.2014.00484
129. Brett Gerwin, MD, e James Kimble, M. Identifying and Treating Toxoplasmosis - *American Academy of Ophthalmology*. (2007)
130. Pearson, P. A., Piracha, A. R., Sen, H. A. & Jaffe, G. J. Atovaquone for the treatment of toxoplasma retinochoroiditis in immunocompetent patients. *Ophthalmology* **106**, 148–153 (1999). doi:10.1016/S0161-6420(99)90021-0
131. Montazeri, M. *et al.* Drug Resistance in *Toxoplasma gondii*. *Front. Microbiol.* **9**, 2587 (2018). doi:10.3389/fmicb.2018.02587
132. Christophe, A. R. *et al.* Atovaquone: A Valuable Therapeutic Option in *Toxoplasma Retinochoroiditis*. *J. Clin. Exp. Ophthalmol.* **6**, 1–4 (2015). doi:10.4172/2155-9570.1000418
133. Samuel, B. U. *et al.* Delivery of antimicrobials into parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 14281–6 (2003). doi:10.1073/pnas.2436169100
134. Montazeri, M. *et al.* A Systematic Review of In vitro and In vivo Activities of Anti-Toxoplasma Drugs and Compounds (2006–2016). *Front. Microbiol.* **8**, 25 (2017). doi:10.3389/fmicb.2017.00025
135. Wei, H.-X., Wei, S.-S., Lindsay, D. S. & Peng, H.-J. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Anti-Toxoplasma gondii Medicines in Humans.

- PLoS One* **10**, e0138204 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0138204
136. Martins-Duarte, E. S. *et al.* Ciprofloxacin Derivatives Affect Parasite Cell Division and Increase the Survival of Mice Infected with *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* **10**, e0125705 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0125705
137. Mulhall, J. P. & Bergmann, L. S. Ciprofloxacin-induced acute psychosis. *Urology* **46**, 102–103 (1995). doi:10.1016/S0090-4295(99)80171-X
138. Acar, S., Keskin-Arslan, E., Erol-Coskun, H., Kaya-Temiz, T. & Kaplan, Y. C. Pregnancy outcomes following quinolone and fluoroquinolone exposure during pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *Reprod. Toxicol.* **85**, 65–74 (2019). doi:10.1016/j.reprotox.2019.02.002
139. Giamarellou, H. *et al.* Pharmacokinetics of three newer quinolones in pregnant and lactating women. *Am. J. Med.* **87**, S49–S51 (1989). doi:10.1016/00029343(89)90021-1
140. Bhargava, H. N. & Leonard, P. A. Triclosan: Applications and safety. *Am. J. Infect. Control* **24**, 209–218 (1996). doi:10.1016/S0196-6553(96)90017-6
141. Russell, A. D. Whither triclosan? *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 693–695 (2004). doi:10.1093/jac/dkh171
142. McLeod, R. *et al.* Triclosan inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* by inhibition of Apicomplexan Fab I. *Int. J. Parasitol.* **31**, 109–113 (2001). doi:10.1016/S0020-7519(01)00111-4
143. Cheng, G. *et al.* Design, synthesis, and biological activity of diaryl ether inhibitors of *Toxoplasma gondii* enoyl reductase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 2035–2043 (2013). doi:10.1016/j.bmcl.2013.02.019
144. El-Zawawy, L. A., El-Said, D., Mossallam, S. F., Ramadan, H. S. & Younis, S. S. Triclosan and triclosan-loaded liposomal nanoparticles in the treatment of acute experimental toxoplasmosis. *Exp. Parasitol.* **149**, 54–64 (2015). doi:10.1016/J.EXPPARA.2014.12.007
145. Neville, A. J. *et al.* Clinically Available Medicines Demonstrating Anti-*Toxoplasma* Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 7161–7169 (2015). doi:10.1128/AAC.02009-15
146. Peng, Z.-Y. *et al.* Some phosphonic acid analogs as inhibitors of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, a novel target in *Toxoplasma gondii*. *Biochem. Pharmacol.* **49**, 105–113 (1995). doi:10.1016/0006-2952(94)00437-Q
147. Galaka, T. *et al.* Antiparasitic Activity of Sulfur- and Fluorine-Containing Bisphosphonates against Trypanosomatids and Apicomplexan Parasites. *Molecules* **22**, 82 (2017). doi:10.3390/molecules22010082
148. Li, Z.-H., Li, C., Szajnman, S. H., Rodriguez, J. B. & Moreno, S. N. J. Synergistic Activity between Statins and Bisphosphonates against Acute Experimental Toxoplasmosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e02628-16 (2017). doi:10.1128/AAC.02628-16
149. Li, Z.-H., Ramakrishnan, S., Striepen, B. & Moreno, S. N. J. *Toxoplasma gondii* Relies on Both Host and Parasite Isoprenoids and Can Be Rendered Sensitive to

- Atorvastatin. *PLoS Pathog.* **9**, e1003665 (2013). doi:10.1371/journal.ppat.1003665
150. Rodrigues, C. O. *et al.* Vacuolar proton pyrophosphatase activity and pyrophosphate (PPi) in *Toxoplasma gondii* as possible chemotherapeutic targets. *Biochem. J.* **349**, 737–45 (2000). doi:10.1042/bj3490737
151. Burda-Grabowska, M. *et al.* Bisphosphonic acids and related compounds as inhibitors of nucleotide- and polyphosphate-processing enzymes: A PPK1 and PPK2 case study. *Chem. Biol. Drug Des.* **93**, 1197-1206 (2018). doi:10.1111/cbdd.13439
152. Merino, P. *et al.* Chemical approaches to inhibitors of isoprenoid biosynthesis: targeting farnesyl and geranylgeranyl pyrophosphate synthases. *RSC Adv.* **7**, 10947–10967 (2017). doi:10.1039/C6RA28316K
153. Szajnman, S. H. *et al.* 1. In Vitro and In Vivo Activity of Sulfur-Containing Linear Bisphosphonates against Apicomplexan Parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e01590-16 (2016). doi:10.1128/AAC.01590-16
154. Rodriguez, J. B. & Szajnman, S. H. New antibacterials for the treatment of toxoplasmosis; a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **22**, 311–333 (2012). doi:10.1517/13543776.2012.668886
155. Sullivan, W. J., Radke, J. B., Kim, K. & White, M. W. Epigenetic and Genetic Factors that Regulate Gene Expression in *Toxoplasma gondii*. in *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods*. 613–645 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-396481-6.00018-0
156. Darkin-Rattray, S. J. *et al.* Apicidin: A novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13143-13147 (1996). doi:10.1073/PNAS.93.23.13143
157. Sullivan Jr, W. J., Smith, A. T. & Joyce, B. R. Understanding mechanisms and the role of differentiation in pathogenesis of *Toxoplasma gondii*: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104**, 155–161 (2009). doi:10.1590/S0074-02762009000200005
158. Singh, S. B. *et al.* Structure, Histone Deacetylase, and Antiprotozoal Activities of Apicidins B and C, Congeners of Apicidin with Proline and Valine Substitutions. *Org. Lett.* **3**, 2815–2818 (2001). doi:10.1021/ol016240g
159. Colletti, S. L., Li, C., Fisher, M. H., Wyvratt, M. J. & Meinke, P. T. Tryptophan-replacement and indole-modified apicidins: synthesis of potent and selective antiprotozoal agents. *Tetrahedron Lett.* **41**, 7825–7829 (2000). doi:10.1016/S0040-4039(00)01363-0
160. Meinke, P. T. *et al.* Synthesis of Apicidin-Derived Quinolone Derivatives: Parasite-Selective Histone Deacetylase Inhibitors and Antiproliferative Agents. *J. Med. Chem.* **43**, 4919–4922 (2000). doi:10.1021/jm0001976
161. Ma, C. *et al.* Secondary Mutations Correct Fitness Defects in *Toxoplasma gondii* With Dinitroaniline Resistance Mutations. *Genetics* **180**, 845-856 (2008). doi:10.1534/genetics.108.092494
162. Stokkermans, T. J. W. *et al.* Inhibition of *Toxoplasma gondii* Replication by

- Dinitroaniline Herbicides. *Experimental Parasitology* **84**, 355-370 (1996). doi:10.1006 / expr.1996.0124
163. Ralph, S. A., D’Ombrain, M. C. & McFadden, G. I. The apicoplast as an antimalarial drug target. *Drug Resist. Updat.* **4**, 145–151 (2001). doi:10.1054/drup.2001.0205
164. Schönbrunn, E. *et al.* Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1376–80 (2001). doi:10.1073/pnas.98.4.1376
165. Ajioka, J. W., Fitzpatrick, J. M. & Reitter, C. P. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert Rev. Mol. Med.* **3**, 1-19 (2001). doi:10.1017/S1462399401002204
166. Gasnier, C. *et al.* Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* **262**, 184–191 (2009). doi:10.1016/j.tox.2009.06.006
167. Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N. & Seralini, G.-E. Differential Effects of Glyphosate and Roundup on Human Placental Cells and Aromatase. *Environ. Health Perspect.* **113**, 716–720 (2005). doi:10.1289/ehp.7728
168. Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T. & Satayavivad, J. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food Chem. Toxicol.* **59**, 129–136 (2013). doi:10.1016/J.FCT.2013.05.057
169. Wang, X., Howell, C. P., Chen, F., Yin, J. & Jiang, Y. Gossypol-A Polyphenolic Compound from Cotton Plant. *Adv. Food Nutr. Res.* **58**, 215–263 (2009). doi:10.1016/S1043-4526(09)58006-0
170. Dodou, K. Investigations on gossypol: past and present developments. *Expert Opin. Investig. Drugs* **14**, 1419–1434 (2005). doi:10.1517/13543784.14.11.1419
171. Bauer, J. A. *et al.* Reversal of cisplatin resistance with a BH3 mimetic, (-)-gossypol, in head and neck cancer cells: role of wild-type p53 and Bcl-xL. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 1096–104 (2005). doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0081
172. Abdelbaset, A. E. *et al.* Lactate dehydrogenase in *Toxoplasma gondii* controls virulence, bradyzoite differentiation, and chronic infection. *PLoS One* **12**, e0173745 (2017). doi:10.1371/journal.pone.0173745
173. Qian, S. & Wang, Z. Gossypol: A Potential Antifertility Agent for Males. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **24**, 329–360 (1984). doi:10.1146/annurev.pa.24.040184.001553
174. Cook, T. *et al.* Divergent polyamine metabolism in the Apicomplexa. *Microbiology* **153**, 1123–1130 (2007). doi:10.1099/mic.0.2006/001768-0
175. Miller, L. H. & Su, X. Artemisinin: discovery from the Chinese herbal garden. *Cell* **146**, 855–8 (2011). doi:10.1016/j.cell.2011.08.024
176. Klayman, D. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* **228**, 1049–1055 (1985). doi:10.1126/science.3887571

177. Sidhu, A. B. S., Verdier-Pinard, D. & Fidock, D. A. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfprt* mutations. *Science* **298**, 210–3 (2002). doi:10.1126/science.1074045
178. Cui, L. & Su, X. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **7**, 999–1013 (2009). doi:10.1586/eri.09.68
179. Shen, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. *Cell* **163**, 1297–300 (2015). doi:10.1016/j.cell.2015.11.031
180. Su, X.-Z. & Miller, L. H. The discovery of artemisinin and the Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Sci. China. Life Sci.* **58**, 1175–9 (2015). doi:10.1007 / s11427-015-4948-7
181. Hsu, E. Reflections on the ‘discovery’ of the antimalarial qinghao. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **61**, 666–70 (2006). doi:10.1111/j.1365-2125.2006.02673.x
182. Tu, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat. Med.* **17**, 1217–1220 (2011). doi:10.1038/nm.2471
183. Chang, Z. The discovery of Qinghaosu (artemisinin) as an effective anti-malaria drug: A unique China story. *Sci China Life Sci* **59**, 81–88 (2016). doi:10.1007/s11427-015-4988-z
184. Webster, H. K. & Lehnert, E. K. Chemistry of artemisinin: an overview. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**, 27–29 (1994). doi:10.1016/0035-9203(94)90467-7
185. Luo, X.-D. & Shen, C.-C. The chemistry, pharmacology, and clinical applications of qinghaosu (Artemisinin) and its derivatives. *Med. Res. Rev.* **7**, 29–52 (1987). doi:10.1002/med.2610070103
186. O’Neill, P. M. & Posner, G. H. A Medicinal Chemistry Perspective on Artemisinin and Related Endoperoxides. *J. Med. Chem.* **47**, 2945–2964 (2004). doi:10.1021/jm030571c
187. Nagamune, K., Moreno, S. N. J. & Sibley, L. D. Artemisinin-resistant mutants of *Toxoplasma gondii* have altered calcium homeostasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3816–23 (2007). doi:10.1128/AAC.00582-07
188. Cortes, S. *et al.* In vitro susceptibility of *Leishmania infantum* to artemisinin derivatives and selected trioxolanos. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 5032–5035 (2015). doi:10.1128/AAC.00298-15
189. Balint, G. A. Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. *Pharmacol. Ther.* **90**, 261–265 (2001). doi:10.1016/S0163-7258(01)00140-1
190. Alam, P. *et al.* Isolation, characterization and structural studies of amorpho - 4, 11-diene synthase (ADS(3963)) from *Artemisia annua* L. *Bioinformation* **4**, 421–429 (2010). doi:10.6026/97320630004421
191. Aderibigbe, B. Design of Drug Delivery Systems Containing Artemisinin and Its Derivatives. *Molecules* **22**, 323 (2017). doi:10.3390/molecules22020323
192. D’Angelo, J. G., Bordón, C., Posner, G. H., Yolken, R. & Jones-Brando, L. Artemisinin derivatives inhibit *Toxoplasma gondii* in vitro at multiple steps in the

- lytic cycle. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, 146–50 (2009). doi:10.1093/jac/dkn451
193. Dunay, I. R., Chan, W. C., Haynes, R. K. & Sibley, L. D. Artemisone and artemiside control acute and reactivated toxoplasmosis in a murine model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4450–6 (2009). doi:10.1128/AAC.00502-09
194. Nagelschmitz, J. *et al.* First Assessment in Humans of the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Ex Vivo Pharmacodynamic Antimalarial Activity of the New Artemisinin Derivative Artemisone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3085–3091 (2008). doi:10.1128/AAC.01585-07
195. Muraleedharan, K. M. & Avery, M. A. Advances in the Discovery of New Antimalarials. in *Comprehensive Medicinal Chemistry II* 765–814 (Elsevier, 2008). doi:10.1016/B0-08-045044-X/00227-3
196. Gomes, T. C., Andrade Júnior, H. F. de, Lescano, S. A. Z. & Amato-Neto, V. In vitro action of antiparasitic drugs, especially artesunate, against *Toxoplasma gondii*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **45**, 485–490 (2012). doi:10.1590/S0037-86822012000400014
197. White, N. J., Hien, T. T. & Nosten, F. H. A Brief History of Qinghaosu. *Trends Parasitol.* **31**, 607–610 (2015). doi:10.1016/j.pt.2015.10.010
198. O’Neill, P. M., Barton, V. E. & Ward, S. A. The Molecular Mechanism of Action of Artemisinin—The Debate Continues. *Molecules* **15**, 1705–1721 (2010). doi:10.3390/molecules15031705
199. Lam, N. S., Long, X., Su, X. & Lu, F. Artemisinin and its derivatives in treating helminthic infections beyond schistosomiasis. *Pharmacol. Res.* **133**, 77–100 (2018). doi:10.1016/j.phrs.2018.04.025
200. Robert, A., Benoit-Vical, F., Claparols, C. & Meunier, B. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 13676–13680 (2005). doi:10.1073/pnas.0500972102
201. Wong, Y. K. *et al.* Artemisinin as an anticancer drug: Recent advances in target profiling and mechanisms of action. *Med. Res. Rev.* **37**, 1492–1517 (2017). doi:10.1002/med.21446
202. Haynes, R. K. & Krishna, S. Artemisinins: activities and actions. *Microbes Infect.* **6**, 1339–1346 (2004). doi:10.1016/j.micinf.2004.09.002
203. Nagamune, K., Beatty, W. L. & Sibley, L. D. Artemisinin induces calcium-dependent protein secretion in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot. Cell* **6**, 2147–56 (2007). doi:10.1128/EC.00262-07
204. OMS/Europe | Prévention des maladies - La toxoplasmose : sensibiliser davantage. Available at: <http://www.euro.who.int/fr/health-topics/disease-prevention/pages/news/news/2016/11/toxoplasmosis-greater-awareness-needed>. (Accessed: 31st October 2019)
205. Jones-Brando, L., D’Angelo, J., Posner, G. H. & Yolken, R. In vitro inhibition of *Toxoplasma gondii* by four new derivatives of artemisinin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 4206–8 (2006). doi:10.1128/AAC.00793-06
206. Meshnick, S. R., Taylor, T. E. & Kamchonwongpaisan, A. S. Artemisinin and the

- Antimalarial Endoperoxides: from Herbal Remedy to Targeted Chemotherapy. *Microbiological Reviews* **60**, 301-315 (1996).
207. Opsenica, D. M. & Šolaja, B. A. Antimalarial peroxides. *J. Serb. Chem. Soc* **74**, 1155–1193 (2009). doi:10.2298/JSC09111550
208. Lobo, L. *et al.* New endoperoxides highly active in vivo and in vitro against artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* **17**, 1–11 (2018). doi:10.1186/s12936-018-2281-x
209. Vennerstrom, J. L. *et al.* Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. *Nature* **430**, 900–904 (2004). doi:10.1038/nature02779
210. Dong, Y. *et al.* Spiro and Dispiro-1,2,4-trioxolanes as Antimalarial Peroxides: Charting a Workable Structure–Activity Relationship Using Simple Prototypes. *J. Med. Chem.* **48**, 4953–4961 (2005). doi:10.1021/jm049040u
211. Jefford, C. New developments in synthetic peroxidic drugs as artemisinin mimics. *Drug Discov. Today* **12**, 487–495 (2007). doi:10.1016/j.drudis.2007.04.009
212. Charman, S. A. *et al.* Synthetic ozonide drug candidate OZ439 offers new hope for a single-dose cure of uncomplicated malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4400-4405 (2011). doi:10.1073/PNAS.1015762108
213. Parulkar, A. S. & Shabaraya, A. R. A novel approach for the use of arterolane maleate in treatment of malaria. *J. Pharm. Sci. Emerg. Drugs* **7**, 702–718 (2018). doi:10.4172/2380-9477-c3-012
214. Phyto, A. P. *et al.* Antimalarial activity of artefenomel (OZ439), a novel synthetic antimalarial endoperoxide, in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria: an open-label phase 2 trial. *Lancet. Infect. Dis.* **16**, 61–69 (2016). doi:10.1016/S1473-3099(15)00320-5
215. O’Neill, P. M. *et al.* Identification of a 1,2,4,5-Tetraoxane Antimalarial Drug-Development Candidate (RKA 182) with Superior Properties to the Semisynthetic Artemisinins. *Angew. Chemie Int. Ed.* **49**, 5693–5697 (2010). doi:10.1002/anie.201001026
216. Franco, L. L. *et al.* Synthesis and Antimalarial Activity of Dihydroperoxides and Tetraoxanes Conjugated with Bis(benzyl)acetone Derivatives. *Chem. Biol. Drug Des.* **79**, 790–797 (2012). doi:10.1111/j.1747-0285.2012.01345.x
217. Opsenica, D. *et al.* Tetraoxanes as inhibitors of apicomplexan parasites *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* and anti-cancer molecules. *J. Serbian Chem. Soc.* **80**, 1339–1359 (2015). doi:10.2298/JSC150430063O