

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**GABRIEL CARVALHO LAMBERT**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO CICLOPIROX OLAMINA E INDOMETACINA NO  
TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE CEREBRAL CRÔNICA EXPERIMENTAL: UM  
ESTUDO BASEADO EM REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS**

**Alfenas-MG**

**2026**

**GABRIEL CARVALHO LAMBERT**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO CICLOPIROX OLAMINA E INDOMETACINA NO  
TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE CEREBRAL CRÔNICA EXPERIMENTAL: UM  
ESTUDO BASEADO EM REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Microbiologia e Parasitologia Aplicadas às Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques

Coorientadora: Profª. Dra. Juliana Quero Reimão Dalla Zanna

**Alfenas-MG**

**2026**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Lambert, Gabriel Carvalho.

Avaliação da eficácia do ciclopirox olamina e indometacina no tratamento da toxoplasmose cerebral crônica experimental: um estudo baseado em reposicionamento de fármacos / Gabriel Carvalho Lambert. - Alfenas, MG, 2026.

42 f. : il. -

Orientador(a): Marcos José Marques.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2026.

Bibliografia.

1. Toxoplasmose crônica. 2. Reposicionamento de fármacos. 3. Ciclopirox Olamina. 4. Indometacina. 5. QRT-PCR. I. Marques, Marcos José, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

**GABRIEL CARVALHO LAMBERT****AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO CICLOPIROX OLAMINA E INDOMETACINA NO TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE CEREBRAL CRÔNICA EXPERIMENTAL: UM ESTUDO BASEADO EM REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS**

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 07 de maio de 2026.

Prof. Dr. Marcos José Marques  
Presidente da Banca Examinadora  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Kezia Katiani Gorza Scopel  
Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Marcos José Marques, Professor do Magistério Superior**, em 07/05/2026, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1786928** e o código CRC **37F6D232**.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, que foram o alicerce de toda a minha formação. Sem o apoio incondicional, os valores transmitidos e o incentivo constante para que eu seguisse meus estudos, esta conquista não seria possível. Dedico a eles cada passo desta caminhada.

Ao meu orientador, Professor Marcos José Marques, pela paciência, pelas orientações precisas e pelo compartilhamento de seu vasto conhecimento. Sua condução foi fundamental para o amadurecimento desta pesquisa e da minha postura acadêmica.

Aos meus professores e mestres, que ao longo desses anos contribuíram para minha construção intelectual, provocando reflexões e compartilhando experiências que foram essenciais para a elaboração deste trabalho.

À minha namorada Nathalia, por ser minha companheira fiel e porto seguro. Obrigado por estar ao meu lado em todos os momentos, especialmente nos mais difíceis, oferecendo o apoio emocional e a compreensão necessários para que eu seguisse em frente. Sua presença tornou este percurso muito mais leve.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste sonho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

*Não há verdade além da magia.*  
— John Fowles, *The Magus*

## RESUMO

O *Toxoplasma gondii*, agente etiológico da toxoplasmose, é um protozoário de distribuição global que infecta cerca de um terço da população humana. Embora a infecção aguda seja frequentemente controlada em indivíduos imunocompetentes, o parasito estabelece uma fase crônica caracterizada pela formação de cistos teciduais, predominantemente no Sistema Nervoso Central (SNC). Esta forma latente é quimiorresistente às terapias convencionais e representa um risco permanente de reativação em pacientes imunossuprimidos, podendo evoluir para a neurotoxoplasmose grave, além de estar associada a distúrbios neuropsiquiátricos. Diante da toxicidade dos fármacos atuais e da sua incapacidade de erradicar os cistos cerebrais, a estratégia de reposicionamento de fármacos torna-se imperativa para acelerar a descoberta de novas terapias. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia *in vivo* do Ciclopirox Olamina e da Indometacina no modelo murino de toxoplasmose crônica, após ambos apresentarem resultados promissores na triagem *in vitro*. O Ciclopirox Olamina atua através da quelação de ferro e apresentou uma Concentração Efetiva Média (EC50) de 389,6 nM, baixa citotoxicidade celular (CC50 > 50 µM) e um excelente Índice de Seletividade superior a 128,3. Em paralelo, a Indometacina, um anti-inflamatório não esteroide (AINE), demonstrou uma EC50 de 8,9 µM contra o parasito, aliada à sua alta lipossolubilidade que facilita a transposição da barreira hematoencefálica. O estudo experimental utilizou camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 infectados com a cepa ME49, divididos em ensaios que testaram o tratamento com Ciclopirox (20, 40 e 80 mg/kg) e Indometacina (10 mg/kg), quantificando a carga parasitária cerebral através da técnica de qRT-PCR. Os resultados indicaram que o tratamento com Ciclopirox Olamina não demonstrou o efeito terapêutico esperado nas doses de 20 e 40 mg/kg; apesar de uma tendência de redução na dose de 80 mg/kg, não houve significância estatística. Isso evidencia que sua potente atividade quelante *in vitro* não se traduziu diretamente *in vivo*, possivelmente devido a limitações farmacocinéticas e biodisponibilidade restrita no SNC. Por outro lado, a avaliação terapêutica da Indometacina revelou uma tendência biológica favorável, promovendo a redução da carga parasitária média de 4,61 (grupo não tratado) para 1,48 parasitos. Embora essa redução também não tenha alcançado significância estatística devido à expressiva variabilidade biológica e tamanho amostral restrito, a Indometacina confirmou seu potencial papel não apenas como parasiticida, mas como um adjuvante terapêutico com propriedades de imunomodulação, controle inflamatório e neuroproteção. Conclui-se que os compostos investigados possuem perfis complexos *in vivo*, em que o Ciclopirox necessita de otimizações de dosagem ou formulação, enquanto a Indometacina desponta como uma via promissora coadjuvante que demanda investigações com maior poder estatístico.

**Palavras-chave:** Toxoplasmose crônica; Reposicionamento de fármacos; Ciclopirox Olamina; Indometacina; qRT-PCR.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii*, the etiological agent of toxoplasmosis, is a globally distributed protozoan that infects approximately one-third of the human population. Although acute infection is often controlled in immunocompetent individuals, the parasite establishes a chronic phase characterized by the formation of tissue cysts, predominantly in the Central Nervous System (CNS). This latent form is chemoresistant to conventional therapies and represents a permanent risk of reactivation in immunosuppressed patients, potentially leading to severe neurotoxoplasmosis, in addition to being associated with neuropsychiatric disorders. Given the toxicity of current drugs and their inability to eradicate cerebral cysts, the strategy of drug repurposing becomes imperative to accelerate the discovery of new therapies. This work aimed to evaluate the *in vivo* efficacy of Ciclopirox Olamine and Indomethacin in a murine model of chronic toxoplasmosis, after both presented promising results in *in vitro* screening. Ciclopirox Olamine acts through iron chelation and exhibited a Mean Effective Concentration (EC<sub>50</sub>) of 389.6 nM, low cellular cytotoxicity (CC<sub>50</sub> > 50 μM), and an excellent Selectivity Index greater than 128.3. In parallel, Indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), demonstrated an EC<sub>50</sub> of 8.9 μM against the parasite, combined with its high lipophilicity that facilitates the crossing of the blood-brain barrier. The experimental study used female C57BL/6 mice infected with the ME49 strain, divided into assays that tested treatment with Ciclopirox (20, 40, and 80 mg/kg) and Indomethacin (10 mg/kg), quantifying the cerebral parasitic load using the qRT-PCR technique. The results indicated that treatment with Ciclopirox Olamine did not demonstrate the expected therapeutic effect at doses of 20 and 40 mg/kg; despite a trend towards reduction at the 80 mg/kg dose, there was no statistical significance. This evidences that its potent chelating activity *in vitro* did not translate directly *in vivo*, possibly due to pharmacokinetic limitations and restricted bioavailability in the CNS. On the other hand, the therapeutic evaluation of Indomethacin revealed a favorable biological trend, promoting the reduction of the mean parasitic load from 4.61 (untreated group) to 1.48 parasites. Although this reduction also did not reach statistical significance due to high biological variability and restricted sample size, Indomethacin confirmed its potential role not only as a parasiticide but as a therapeutic adjuvant with properties of immunomodulation, inflammatory control, and neuroprotection. It is concluded that the investigated compounds have complex *in vivo* profiles, in which Ciclopirox requires optimizations in dosage or formulation, while Indomethacin emerges as a promising adjuvant pathway that demands investigations with greater statistical power.

**Keywords:** Chronic Toxoplasmosis; Drug Repurposing; Ciclopirox Olamine; Indomethacin; qRT-PCR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo biológico do <i>Toxoplasma gondii</i> . .....	16
Figura 2: Estrutura química da Ciclopirox Olamina. ....	20
Figura 3: Estrutura química da Indometacina. ....	21
Figura 4: Carga parasitária cerebral Experimento Ciclopirox. ....	31
Figura 5: Carga parasitária cerebral Experimento Indometacina. ....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório Não Esteroidal
ANOVA	Análise de Variância
BHE	Barreira Hematoencefálica
BSA	Área de Superfície Corporal
C-	Controle Negativo / Não Tratado
C+	Controle Positivo
C-DNA	DNA Complementar
CC50	Concentração Citotóxica Média
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
CPX	Ciclopirox Olamina
Ct	Ciclo Limiar
DALY	Anos de Vida Perdidos por Incapacidade
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC50	Concentração Efetiva Média
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
HFF	Fibroblastos de Prepúcio Humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
IND	Indometacina
IS	Índice de Seletividade

LLC-MK2	Células Epiteliais de Rim de Macaco Rhesus
LPz-IMT/USP	Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo
MMV	Medicines for Malaria Venture
mRNA	RNA Mensageiro
NT	Não Tratado
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, Polymerase Chain Reaction)
PEG400	Polietilenoglicol 400
PGE2	Prostaglandina E2
PRB	Pandemic Response Box
PYR	Pirimetamina
QALY	Anos de Vida Ajustados por Qualidade
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SEM	Erro Padrão da Média
SNC	Sistema Nervoso Central
TARV	Terapia Antirretroviral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	14
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	14
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>14</b>
3.1. TOXOPLASMOSE E <i>TOXOPLASMA GONDII</i> .....	14
3.2. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO.....	17
3.3. CICLOPIROX OLAMINA.....	19
3.4. INDOMETACINA.....	20
3.5. MODELOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DE FÁRMACOS ANTI- <i>T. GONDII</i> .....	22
3.6. DIAGNÓSTICO E QUANTIFICAÇÃO MOLECULAR DA CARGA PARASITÁRIA.....	23
<b>4. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>24</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>25</b>
5.1. TRIAGEM E SELEÇÃO DOS FÁRMACOS.....	25
5.2. ANIMAIS E PARASITO.....	25
5.3. ESTABELECIMENTO DO MODELO MURINO.....	26
5.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	26
5.5. ANÁLISE MOLECULAR E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	27
<b>5.5.1. Extração de RNA total.....</b>	<b>27</b>
<b>5.5.2. Síntese de DNA Complementar (C-DNA).....</b>	<b>28</b>
<b>5.5.3. qRT-PCR.....</b>	<b>29</b>
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
6.1. ENSAIOS IN VITRO DA CICLOPIROX OLAMINA E INDOMETACINA.....	30
6.2. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA <i>IN VIVO</i> DO CICLOPIROX OLAMINA.....	30
6.3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA <i>IN VIVO</i> DA INDOMETACINA.....	32
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>42</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii*, agente etiológico da toxoplasmose, é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, cuja descoberta científica remonta a 1908 por Nicolle e Manceaux (DUBEY, 2008). Este parasito destaca-se por sua extraordinária capacidade de adaptação biológica, sendo capaz de infectar virtualmente todas as espécies de animais de sangue quente, incluindo seres humanos, aves e mamíferos (COURA, 2018). Embora estimativas históricas clássicas sugiram que um terço da população mundial esteja infectada (DUBEY, 2008), metanálises recentes de Sengupta *et al.* (2025) refinam esse dado, confirmando uma soroprevalência global de 31% (IC 95%: 28-34%). No entanto, a distribuição epidemiológica é marcadamente heterogênea; na América do Sul, as taxas de soropositividade em gestantes frequentemente excedem 45%, conforme reportado por Bigna *et al.* (2020), consolidando a região como uma das áreas de maior endemicidade e desafio para as políticas de saúde pública.

A patogênese da toxoplasmose é caracterizada por um ciclo de vida complexo que alterna entre a fase de replicação rápida (taquizoítos), típica da infecção aguda, e a fase de latência crônica (bradizoítos), onde o parasito se organiza em cistos teciduais persistentes. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção é geralmente assintomática ou oligossintomática, controlada por uma resposta imune robusta mediada por células T e citocinas pró-inflamatórias como o IFN- $\gamma$ . Contudo, a persistência vitalícia de cistos no Sistema Nervoso Central (SNC) e tecidos musculares representa uma "bomba-relógio" biológica. Em cenários de imunossupressão — como em pacientes com HIV/AIDS, transplantados ou sob quimioterapia — a reativação desses cistos pode levar à encefalite toxoplásmica grave, miocardite e óbito (VIDAL, 2019). Além do risco de reativação, Bisetegn *et al.* (2023) reforçaram a correlação entre a infecção crônica latente e o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos, demonstrando uma soroprevalência de 38,27% em pacientes com transtornos mentais e neurológicos.

No cenário brasileiro, a toxoplasmose gestacional e congênita assume proporções críticas. Morais (2023) demonstrou que a prevalência nacional em gestantes sofreu um aumento alarmante de 41,49 para 60,60 casos por 10.000 gestantes no período de 2019 a 2024. Este crescimento é acompanhado por uma carga de doença significativa; Torgerson *et al.* (2013) estimam que a toxoplasmose congênita contribua com uma carga anual de aproximadamente 1,2 milhão de DALYs (anos de vida perdidos por incapacidade) em escala global. A detecção tardia da infecção, muitas vezes ocorrendo apenas no segundo trimestre de gestação, aliada a disparidades socioeconômicas, agrava o prognóstico fetal e sobrecarrega o sistema de saúde, cujo mercado de tratamento é projetado para movimentar USD 1,36 bilhão até 2035 (RESEARCH NESTER, 2025).

Apesar de mais de um século de conhecimento sobre o parasito, o arsenal terapêutico permanece estagnado e limitado. A terapia padrão de ouro, composta pela combinação de Pirimetamina e Sulfadiazina, foca exclusivamente na fase de taquizoítos, sendo ineficaz contra os bradizoítos encistados (KONSTANTINOVIC *et al.*, 2019). Além da incapacidade de erradicar a infecção crônica, esses fármacos apresentam alta toxicidade medular e reações de hipersensibilidade, o que frequentemente leva à interrupção do tratamento (SHAMMAA; POWELL; BENMERZOUGA, 2021). Diante da urgência por novas alternativas e do alto custo e tempo demandados pelo desenvolvimento de fármacos de novo, a estratégia de reposicionamento de fármacos surge como uma via pragmática e acelerada. Esta abordagem utiliza compostos já aprovados para outras indicações clínicas, cujos perfis de segurança e farmacocinética em humanos já são conhecidos, reduzindo drasticamente os riscos e custos regulatórios (OLIVEIRA *et al.*, 2025).

Neste contexto, o Ciclopirox Olamina (CPX) apresenta-se como um candidato de alto interesse. Originalmente um antifúngico de uso tópico, o CPX possui um mecanismo de ação singular baseado na quelação de cátions polivalentes, especialmente o ferro ( $Fe^{3+}$ ). Como o ferro é um cofator essencial para enzimas vitais do metabolismo oxidativo e replicação do DNA do *T. gondii*, sua privação induz a parada do ciclo celular do parasito (NIEWERTH *et al.*, 2003). Estudos *in vitro* demonstraram que o CPX possui potente atividade contra taquizoítos e potencial ação sobre formas císticas. Entretanto, o grande desafio para sua aplicação na neurotoxoplasmose reside na sua limitada capacidade de transpor a barreira hematoencefálica (BHE) em concentrações terapêuticas, demandando investigações rigorosas em modelos *in vivo* para avaliar sua eficácia sistêmica.

Simultaneamente, a Indometacina, um anti-inflamatório não esteroideal (AINE) derivado do indol, oferece uma perspectiva terapêutica complementar e inovadora. Além de sua conhecida inibição das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), a indometacina demonstrou atividade antiparasitária direta contra o *T. gondii* com uma concentração efetiva média (EC50) de 8,9  $\mu M$ . Sua alta lipossolubilidade permite uma penetração eficiente no SNC, onde pode exercer um papel neuroprotetor multifatorial. Conforme discutido por Da Silva *et al.* (2021), a modulação da cascata inflamatória e a redução do edema cerebral são cruciais para mitigar os danos neuronais durante a encefalite. Avanços recentes em nanotecnologia, como as nanoemulsões funcionalizadas propostas por Lu *et al.* (2024), buscam otimizar ainda mais o direcionamento desses fármacos para o parênquima cerebral, potencializando a eliminação da carga parasitária e a preservação da integridade neuronal. Modelos avançados de cultura celular, como os organoides cerebrais 3D, têm sido fundamentais para validar essas novas abordagens terapêuticas em um

ambiente que mimetiza o SNC humano (HALONEN, 2023).

Portanto, a presente investigação justifica-se pela necessidade imperativa de superar as limitações da terapia convencional. Ao avaliar o potencial de reposicionamento do Ciclopirox Olamina e da Indometacina em um modelo murino de toxoplasmose crônica, este trabalho busca não apenas identificar novos agentes tripanocidas, mas também explorar estratégias que combinem a eliminação do parasito com a proteção do tecido cerebral, visando uma abordagem terapêutica mais holística e eficaz para a neurotoxoplasmose. Diante dessas limitações, hipotetiza-se que fármacos reposicionados com propriedades antiparasitárias e/ou imunomoduladoras possam reduzir a carga cística cerebral e modular a resposta inflamatória na toxoplasmose crônica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVOS GERAIS**

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a eficácia de fármacos Ciclopirox olamina e indometacina, reposicionados contra *Toxoplasma gondii* em modelo murino de toxoplasmose crônica.

### **2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO**

Quantificar a carga parasitária no tecido cerebral por qRT-PCR visando avaliar a eficácia terapêutica dos fármacos testados

## **3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **3.1. TOXOPLASMOSE E *TOXOPLASMA GONDII***

Toxoplasmose é a parasitose causada pelo agente etiológico *T. gondii*, protozoário do filo Apicomplexa capaz de infectar quase todos os animais de sangue quente, no mundo todo (COURA, 2018, DUBEY, 2008). Conquanto a infecção se desenvolva benignamente ou inaparente em indivíduos imunocompetentes, a mesma pode se mostrar grave em pacientes gestantes ou imunodebilitados. Ademais, a infecção tem sido amplamente relacionada a distúrbios neuropsíquicos, como esquizofrenia (FLEGR, 2013), Alzheimer (BAYANI *et al.*, 2019), transtorno bipolar (DE BARROS *et al.*, 2017), epilepsia e transtorno obsessivo-compulsivo (SADEGHI *et al.*, 2019).

O Ciclo de Vida do *Toxoplasma gondii* (Figura 1) é classificado como heteroxeno, sendo obrigatoriamente caracterizado pela alternância entre hospedeiros e pela ocorrência de fases reprodutivas sexuadas e assexuadas. A perpetuação do parasito na natureza depende de três formas evolutivas principais: os taquizoítos, os bradizoítos e os oocistos. Os taquizoítos

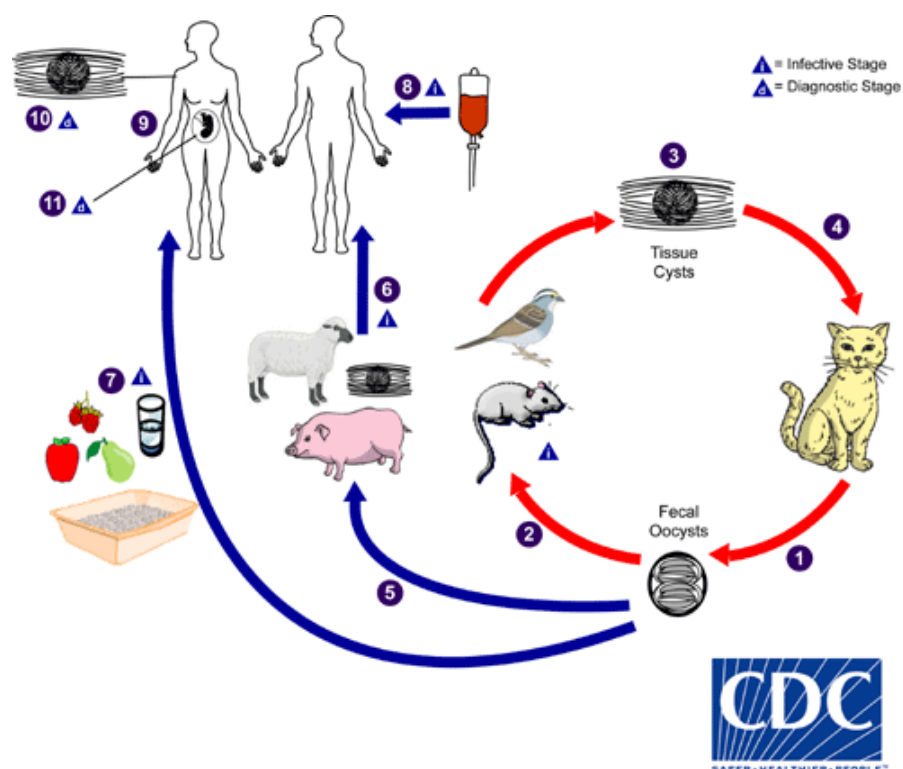
representam as formas de replicação rápida e ativa características da fase aguda da infecção, multiplicando-se no interior do vacúolo parasitóforo de qualquer célula nucleada do hospedeiro por meio de endodiogenia, um processo de divisão interna no qual duas células-filhas são formadas antes da lise da célula-mãe. Sob a pressão da resposta imune adaptativa do hospedeiro, estes taquizoítos sofrem diferenciação biológica e convertem-se em bradizoítos. Os bradizoítos são formas latentes de replicação lenta que se organizam no interior de cistos teciduais dotados de uma parede glicoproteica resistente, apresentando elevado tropismo por tecidos de baixo turnover celular, como o tecido muscular esquelético, o miocárdio e o sistema nervoso central, onde permanecem viáveis durante toda a vida do hospedeiro, caracterizando a fase crônica da toxoplasmose. A terceira forma evolutiva é o oocisto, uma estrutura de resistência ambiental decorrente exclusivamente do processo de reprodução sexuada.

A dinâmica do ciclo biológico do *Toxoplasma gondii* divide-se estritamente em função dos hospedeiros envolvidos. Os hospedeiros definitivos são os membros da família *Felidae*, compreendendo os felinos domésticos e silvestres, os únicos capazes de abrigar o ciclo sexuado ou enteroepitelial. Quando um felídeo ingere tecidos contendo cistos ou alimentos contaminados com oocistos esporulados, os parasitos liberados invadem os enterócitos do intestino delgado. Inicialmente, ocorre uma expansão clonal assexuada por esquizogonia, também denominada merogonia, que antecede a diferenciação celular em gametas masculinos flagelados, os microgametas, e gametas femininos, os macrogametócitos. A fertilização resulta na formação de um zigoto que, após sintetizar uma parede celular rígida, é excretado nas fezes do felino como um oocisto imaturo ou não esporulado. Uma vez no meio ambiente, sob condições favoráveis de oxigenação, umidade e temperatura, este oocisto passa pelo processo de esporulação em um período de um a cinco dias, tornando-se esporulado e altamente infectante, contendo em seu interior dois esporocistos com quatro esporozoítos cada. Por outro lado, o ciclo assexuado ou tecidual ocorre nos hospedeiros intermediários, uma ampla gama de animais endotérmicos que engloba aves e a maioria dos mamíferos, incluindo o ser humano. Nesses organismos, o parasito realiza unicamente a reprodução assexuada; após a penetração na mucosa intestinal, as formas infectantes convertem-se em taquizoítos, que se disseminam sistematicamente por via hematogênica ou linfática até que a imunidade celular, mediada principalmente por interferon-gama e linfócitos TCD8+, force o encistamento na forma de bradizoítos.

As vias de infecção e transmissão do *Toxoplasma gondii* para os hospedeiros intermediários baseiam-se em três mecanismos principais. A primeira via consiste na ingestão de oocistos esporulados presentes no ambiente, ocorrendo por transmissão fecal-oral devido ao consumo de água, solo, vegetais ou fômites contaminados por fezes de felinos. A segunda via

está atrelada ao carnivorismo, caracterizada pela ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos viáveis ao se consumir carne crua ou insuficientemente cozida de outros hospedeiros intermediários, como suínos, ovinos e roedores. A terceira via baseia-se na transmissão vertical ou congênita, que se estabelece quando uma fêmea ou gestante adquire a infecção primária por taquizoítos durante o período gestacional, permitindo que o parasito colonize o tecido placentário e atravesse a barreira transplacentária para infectar o feto. O ciclo biológico fecha-se e reinicia-se de forma contínua quando um hospedeiro definitivo consome tecidos de um hospedeiro intermediário colonizado por cistos viáveis, restabelecendo a fase enteroepitelial e garantindo a dispersão epidemiológica do protozoário na biosfera.

Figura 1: Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*. Legenda: Triângulo azul: Indica uma fase infectante (o parasito está em uma forma que pode infectar um novo hospedeiro). Triângulo invertido azul: Indica uma fase diagnóstica (o parasito ou seus produtos podem ser detectados para diagnosticar a infecção).



Fonte: CDC - DPDx - Toxoplasmose (2025)

Vale ressaltar a água contaminada como fator de risco, pois tal forma de infecção está relacionada a múltiplos surtos de toxoplasmose no mundo todo (PINTO- FERREIRA *et al.*, 2019; PITTMAN; KNOLL, 2015; SWIERZY *et al.*, 2014).

A porcentagem mundial estimada de pessoas infectadas por *T. gondii*, 30%, é alta. Além

disso, o protozoário não está limitado somente a determinadas áreas endêmicas, mas se encontra presente nos sete continentes. Os gastos estimados com a doença chegam a 3 bilhões de dólares, e são perdidos 11 mil Anos de Vida Ajustados por Qualidade (QALY) por ano para a toxoplasmose (ELSHEIKHA *et al.*, 2020; MARRA, 2018). Sabe-se que o índice de adultos infectados, no Brasil, atinge a faixa de 80% (FERREIRA, 2020) e os índices de mortalidade são altos, com registros de 5.612.892 mortes na região Sudeste do país, entre os anos de 2009 e 2018 (SOUZA *et al.*, 2020).

Pouco é feito no sentido de monitoramento da doença, principalmente devido ao fato de que o agente etiológico perpassa por muitas espécies diferentes, o que inviabiliza a ação de vigia, em muitos casos. Isto posto, é importante destacar que, com vistas a prevenir a toxoplasmose, é imprescindível que as ações sejam pensadas e realizadas em redes interdisciplinares, de forma a cobrir desde o atendimento e diagnóstico do paciente suspeito de tal infecção até a notificação de casos e surtos, como no modelo proposto por Alonso Aguirre *et al* (2019).

### 3.2. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico da toxoplasmose é fundamentado primordialmente em métodos sorológicos que detectam anticorpos específicos das classes IgM e IgG, como a técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e a quimioluminescência, embora a reação de Sabin-Feldman permaneça como o padrão-ouro de referência (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2020). Devido à natureza frequentemente assintomática da infecção primária em indivíduos imunocompetentes, o diagnóstico clínico é desafiador, sendo muitas vezes postergado até a manifestação de sintomas graves ou identificado apenas por meio de rastreamento compulsório, como ocorre no pré-natal de gestantes ou no monitoramento de pacientes imunodeprimidos, especialmente aqueles vivendo com HIV (MCARTHUR *et al*, 2018).

O diagnóstico molecular da toxoplasmose baseia-se primordialmente na detecção de sequências específicas do DNA de *Toxoplasma gondii* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), destacando-se atualmente o emprego da PCR em tempo real (qPCR) devido à sua elevada sensibilidade, especificidade e capacidade de quantificação da carga parasitária. Na prática laboratorial contemporânea, a escolha dos alvos moleculares é um fator crítico para a eficiência do ensaio, sendo a sequência repetitiva de 529 pares de bases (REP-529, que possui de 200 a 300 cópias repetidas no genoma do parasito) o alvo de eleição na maioria dos centros de referência globais, superando o tradicional gene B1 (com cerca de 35 cópias) em termos de limite mínimos de detecção. A aplicação atual desse método concentra-se de forma estratégica no diagnóstico antenatal da toxoplasmose congênita, realizado via amniocentese a partir do líquido amniótico a partir da 18ª semana de gestação, bem como na triagem e monitoramento de

infecções disseminadas ou reativações neurológicas (encefalite toxoplásmica) em pacientes imunocomprometidos, utilizando amostras de sangue, líquido (LCR), lavado broncoalveolar ou biópsias teciduais. Adicionalmente, novas tecnologias como a PCR digital em gotículas (ddPCR) começam a ser avaliadas para refinamentos na quantificação absoluta do DNA parasitário, embora a qPCR permaneça como o padrão de referência molecular na rotina diagnóstica (HOMAN et al., 2000).

No contexto gestacional, o protocolo de testagem é rigoroso e visa a detecção precoce da soroconversão para prevenir a transmissão vertical. Recomenda-se a triagem sorológica logo na primeira consulta de pré-natal. Caso a gestante apresente IgG e IgM reagentes, é imperativa a realização do Teste de Avidéz de IgG, preferencialmente até a 16ª semana de gestação. Uma alta avidéz (> 60%) nesse período exclui a possibilidade de infecção aguda durante a gravidez, indicando que o contato com o parasito ocorreu há pelo menos quatro meses (BRASIL, 2024). Por outro lado, resultados de baixa avidéz ou soroconversão durante o acompanhamento indicam infecção aguda, exigindo investigação fetal imediata por meio de amniocentese para a realização de PCR (Reação em cadeia de polimerase) no líquido amniótico, procedimento indicado a partir da 18ª semana gestacional (VILLARD et al., 2016).

O tratamento farmacológico atual é direcionado à fase aguda da doença, quando o parasito se encontra na forma replicativa de taquizoíta (WEI *et al.*, 2015). Na gestação, o esquema terapêutico inicial baseia-se na administração de Espiramicina (3g/dia), um macrolídeo que não atravessa a barreira placentária em concentrações terapêuticas, mas concentra-se na placenta, agindo como uma barreira para reduzir o risco de transmissão vertical em até 60% (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2020). Caso a infecção fetal seja confirmada via PCR ou ultrassonografia, o protocolo exige a substituição da espiramicina pela tríplice clássica: Pirimetamina, Sulfadiazina e Ácido Folínico, que possuem ação sistêmica no feto, embora apresentem maior toxicidade (BRASIL, 2024).

A combinação de Pirimetamina e Sulfadiazina atua por meio do bloqueio sequencial da síntese de ácido fólico (ação antifolato), essencial para o metabolismo do parasito. Entretanto, essa terapia impõe riscos severos ao hospedeiro, incluindo supressão da medula óssea, distúrbios gastrointestinais e reações de hipersensibilidade, podendo evoluir para quadros fatais (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2020). Em neonatos com toxoplasmose congênita, o tratamento é prolongado e agressivo, estendendo-se por até um ano para mitigar sequelas neurológicas e oculares permanentes (NEU *et al.*, 2015).

A toxoplasmose cerebral, por sua vez, é uma das causas mais recorrentes de lesões

intracerebrais em pacientes com HIV, apresentando natureza recidivante devido à persistência de cistos teciduais (MARRA, 2018). O parasito e o vírus mantêm uma relação colaborativa no hospedeiro, onde a imunodeficiência favorece a reativação da infecção latente (ELSHEIKHA, 2020). O manejo nesses pacientes é dificultado pela toxicidade compartilhada entre a terapia antirretroviral (TARV) e os fármacos anti-*T. gondii*, que podem exacerbar a mielossupressão e impedir a aplicação concomitante ideal das terapias (NISSAPATORN; SAWANGJAROEN, 2011).

Diante da incapacidade dos fármacos atuais em erradicar a fase crônica (cística) e da alta toxicidade associada, a busca por novas alternativas terapêuticas é imperativa. O reposicionamento de fármacos surge como uma alternativa estratégica, aproveitando medicamentos já aprovados para outras indicações para acelerar a descoberta de terapias mais seguras e eficazes (OLIVEIRA *et al.*, 2025). Estudos recentes de triagem *in vitro* utilizando bibliotecas como a COVID Box e a Pandemic Response Box (MMV) identificaram compostos promissores que, além de atividade antiparasitária, apresentam propriedades físico-químicas favoráveis para a transposição da barreira hematoencefálica, representando candidatos ideais para investigações *in vivo* (SANTOS *et al.*, 2023a; 2023b). A descoberta de um composto capaz de eliminar o parasito dentro dos cistos cerebrais permanece como o principal desafio e objetivo da pesquisa contemporânea em toxoplasmose.

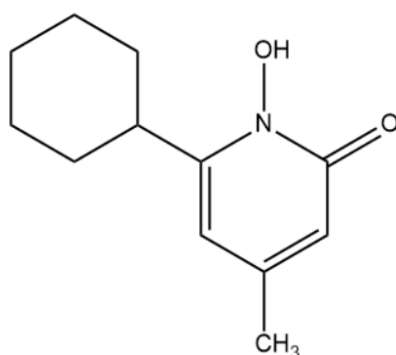
### 3.3. CICLOPIROX OLAMINA

O Ciclopirox Olamina (CPX) é um agente antimicrobiano sintético derivado da hidroxipiridona, estruturalmente distinto dos antifúngicos azólicos e de outras classes convencionais (ABRAMS *et al.*, 1991). Clinicamente estabelecido como um fármaco de uso tópico, o CPX apresenta um amplo espectro de ação, combatendo dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos, além de demonstrar atividade antibacteriana contra microrganismos gram-positivos e gram-negativos, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (JUE *et al.*, 1985). Recentemente, o fármaco emergiu como um candidato relevante em estratégias de reposicionamento de fármacos, não por sua ação na membrana celular, mas devido ao seu mecanismo intracelular específico de quelação de cátions polivalentes, nomeadamente o ferro ( $Fe^{3+}$ ), interferindo em processos enzimáticos vitais dependentes deste metal (PANT *et al.*, 2025).

No contexto da parasitologia, a relevância do Ciclopirox reside na dependência metabólica do *Toxoplasma gondii* pelo ferro para sua replicação e sobrevivência. Estudos *in vitro* demonstraram que a capacidade do fármaco de atuar como um quelante de ferro inibe eficazmente o crescimento do parasito, validando-o como um agente com potente atividade anti-*Toxoplasma* (NEVILLE *et al.*, 2015). Triagens recentes utilizando a biblioteca Pandemic

Response Box (PRB) corroboraram esse potencial, revelando uma Concentração Efetiva Média ( $EC_{50}$ ) de  $389,6 \pm 130$  nM contra taquizoítos da cepa RH e uma baixa citotoxicidade em células hospedeiras ( $CC_{50} > 50$   $\mu$ M). Esses parâmetros conferem ao CPX um Índice de Seletividade (IS) superior a 128,3, indicando uma ampla janela terapêutica *in vitro* (SANTOS *et al.*, 2023b). Apesar desse perfil favorável em ensaios celulares, a avaliação em modelos animais é fundamental para determinar se a biodisponibilidade sistêmica e a transposição da barreira hematoencefálica permitem que essa eficácia se traduza no controle da infecção crônica no sistema nervoso central.

Figura 2: Estrutura química da Ciclopirox Olamina. Imagem feita com o ChemDraw Ultra 12.0, em 20/05/2024.



Fonte: elaborado pelo autor (2024)

### 3.4. INDOMETACINA

A indometacina é um anti-inflamatório não esteroideal (AINE) derivado do ácido indolacético, que possui propriedades antipirética, analgésica e anti-inflamatória potentes. Clinicamente, é indicada para o manejo de condições osteoarticulares, como artrite reumatoide e espondilite anquilosante. Seu mecanismo de ação clássico baseia-se na inibição não seletiva das isoformas da enzima ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2), bloqueando a síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. Contudo, evidências sugerem que seus efeitos transcendem a via das COX, influenciando diretamente a atividade neuronal e a hemodinâmica cerebral (LUCAS, 2016).

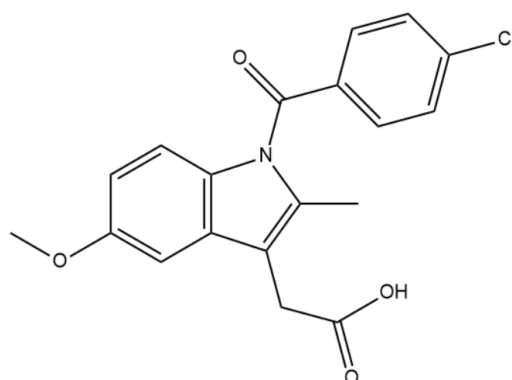
Do ponto de vista farmacodinâmico, a indometacina apresenta um perfil singular no sistema nervoso central (SNC). Diferente de outros AINEs, ela atua como um potente vasoconstritor cerebral, capaz de reduzir o fluxo sanguíneo cerebral em até 40% em modelos animais, além de diminuir a pressão intracraniana (LUCAS, 2016). Essas propriedades, somadas

à redução da hiperemia e do edema cerebral, são cruciais no manejo da encefalite toxoplásmica, onde o controle da inflamação e da compressão mecânica de tecidos e nervos é determinante para o prognóstico do paciente (LUCAS, 2016).

No contexto da parasitologia, a indometacina tem despertado interesse por sua atividade antiparasitária direta e seu potencial imunomodulador. Triagens *in vitro* demonstraram que o fármaco possui uma Concentração Efetiva Média ( $EC_{50}$ ) de 8,9  $\mu\text{M}$  contra o *Toxoplasma gondii*. Além da ação direta, a inibição da prostaglandina E2 ( $\text{PGE}_2$ ) — uma molécula com caráter imunossupressor frequentemente explorada pelo parasito para evadir a resposta imune — pode restaurar a imunidade celular do hospedeiro. Esse efeito imunomodulador já foi observado em outros modelos de doenças parasitárias, como na malária, onde aumentou a resposta linfoproliferativa (RILEY et al., 1989), e na leishmaniose, com o incremento de respostas imunes específicas (CONVIT et al., 1993b).

Para o tratamento da fase crônica da toxoplasmose, a farmacocinética da indometacina é particularmente favorável devido à sua alta lipossolubilidade ( $\log P = 4,27$ ), o que facilita a transposição da barreira hematoencefálica (MUNJAL; ALLAM, 2024). Entretanto, o uso clínico exige cautela devido à elevada taxa de ligação a proteínas plasmáticas, que pode limitar a fração livre do fármaco no SNC (BANNWARTH et al., 1990), e ao risco de toxicidade gastrointestinal (MUNJAL; ALLAM, 2024). Por outro lado, seu histórico de uso em obstetrícia para inibição do trabalho de parto prematuro sugere um perfil de segurança que pode ser explorado em estudos de toxoplasmose congênita, respeitando-se as janelas gestacionais para evitar o fechamento prematuro do ducto arterioso (LUCAS, 2016).

Figura 3: Estrutura química da Indometacina. Imagem feita com o ChemDraw Ultra 12.0, em 17/02/2026.



Fonte: elaborado pelo autor (2026)

### 3.5. MODELOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DE FÁRMACOS ANTI-*T. GONDII*

Há três linhagens principais de *T. gondii* empregadas nos estudos laboratoriais:

- Tipo I é a linhagem composta de cepas virulentas e majoritariamente destinadas a estudos de toxoplasmose aguda, pois os protozoários não se diferenciam imediatamente em bradizoítos após serem inoculados nos animais de experimentação (WANG; SIBLEY, 2020). A cepa mais utilizada do tipo I é a RH (MONTAZERI *et al.*, 2017);
- Tipo II é uma linhagem menos virulenta, caracterizada por causar infecções letais se inoculadas em alta concentração, ou infecções que se desenvolvem cronicamente, se inoculadas em concentrações mais baixas (WANG; SIBLEY, 2020). Cepas dessa linhagem incluem ME49 e PRU (MONTAZERI *et al.*, 2017);
- Tipo III é a linhagem avirulenta, comum em animais na América do Norte, mas muito rara em casos humanos; tal cepa é chamada avirulenta pois, mesmo em doses de desafio, não causam infecções letais em ratos de laboratório (WANG; SIBLEY, 2020). NED e CTG são cepas com tais características (MONTAZERI *et al.*, 2017).

A linhagem celular mais utilizada como hospedeira para cultivo *in vitro* do parasito é a de fibroblastos de prepúcio humano (*human foreskin fibroblasts* - HFF), devido ao taquizoíto se reproduz mais facilmente nesse tipo celular (WANG; SIBLEY, 2020). Outras linhagens celulares que também podem ser utilizadas são LLC-MK2 (*Rhesus monkey kidney epithelial cells*), Vero, Hela, MRC-5 e J774A.1, de acordo com a revisão feita por Montazeri *et al.* (2017).

O modelo animal mais utilizado para estudo de fármacos é o murino (MONTAZERI *et al.*, 2017), sendo que a espécie varia em decorrência da fase e/ou contexto clínico em que a doença será estudada. Em se tratando de fase aguda ou crônica, tal fator é definido pelo parâmetro “sobrevivência cumulativa” (WANG; SIBLEY, 2020), calculado a partir do método de Kaplan-Meier (STEL *et al.*, 2011).

Para toxoplasmose aguda, com cepas do Tipo I, o modelo animal recomendado pelo protocolo de Wang e Sibley (2020) é o CD-1 ou Swiss. Para estudo de toxoplasmose congênita, emprega-se o Hamster (*Mesocricetus auratus*) (FIALHO, 2009). Já para a toxoplasmose crônica, os animais recomendados pelo protocolo de Wang e Sibley são BALB/c, C3H/Hen e C57BL/6.

### 3.6. DIAGNÓSTICO E QUANTIFICAÇÃO MOLECULAR DA CARGA PARASITÁRIA

O rastreamento da atividade parasitária por meio de técnicas moleculares representa um avanço significativo na precisão diagnóstica e na avaliação da eficácia terapêutica. A maioria das doenças parasitárias apresenta desafios diagnósticos consideráveis, decorrentes da alta taxa de reações cruzadas em testes sorológicos e da produção variável de anticorpos específicos pelo

hospedeiro (COURA, 2018). Nesse cenário, a aplicação de métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR) tem se mostrado efetiva para superar limitações de sensibilidade e especificidade.

Diferentemente da PCR convencional, a qRT-PCR permite a detecção e a quantificação simultânea do material genético do parasito. Para o diagnóstico de presença, o alvo molecular mais utilizado é o elemento repetitivo de 529 pares de bases (RE) ou o gene B1, ambos presentes em múltiplas cópias no genoma do *T. gondii*, o que confere à técnica uma sensibilidade superior aos métodos parasitológicos diretos (VIDAL *et al.*, 2004; COLOMBO *et al.*, 2005). No entanto, a detecção isolada de DNA não permite distinguir entre parasitos viáveis e remanescentes genéticos de organismos mortos, uma vez que o DNA pode persistir nos tecidos por períodos prolongados após a eliminação do patógeno (SENGUPTA *et al.*, 2025).

Para contornar essa limitação, a quantificação de RNA mensageiro (mRNA) via RT-qPCR emerge como uma ferramenta de alta especificidade para avaliar a viabilidade e a progressão da doença. Como o mRNA possui uma meia-vida curta e é degradado rapidamente após a morte celular, sua detecção é um indicador fidedigno de parasitos metabolicamente ativos (SUNG *et al.*, 2005). Estudos recentes destacam o uso de alvos como os genes GRA1 (proteína de grânulos densos) e BAG1 (específico de bradizoítos) para monitorar a transição entre as fases aguda e crônica e avaliar a eficácia de novos fármacos em modelos experimentais (HALONEN, 2023; SENGUPTA *et al.*, 2025).

A eficiência da qRT-PCR no diagnóstico da toxoplasmose já foi amplamente demonstrada em diversos contextos clínicos e experimentais (LIU *et al.*, 2015; MINKUS *et al.*, 2019). O método é rotineiramente empregado em estudos epidemiológicos para mapear a prevalência do parasito em diferentes hospedeiros e tecidos (COURA, 2018). Contudo, apesar de sua robustez, ainda há uma carência de trabalhos no Brasil que validem a qRT-PCR como o método padrão para a avaliação da eficácia de fármacos reposicionados contra o *T. gondii* em modelos murinos de infecção crônica. A padronização dessa técnica é fundamental para quantificar a redução da carga cística cerebral e validar se a atividade observada *in vitro* se traduz em uma redução real da viabilidade parasitária *in vivo*.

#### 4. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose representa um desafio crítico para a saúde pública global, dada a sua alta prevalência (DUBEY, 2008) e as severas limitações dos protocolos terapêuticos vigentes. O tratamento padrão, baseado na combinação de Pirimetamina e Sulfadiazina, é marcado por toxicidade significativa e exige períodos prolongados de administração (DUNAY *et al.*, 2018).

Mais crucialmente, inexistente atualmente um fármaco capaz de erradicar a forma cística do *Toxoplasma gondii*, que persiste latente nos tecidos neural e muscular, tornando a infecção crônica quimiorresistente (NEVILLE et al., 2015). Essa persistência é o substrato para a reativação da doença, culminando em quadros graves de neurotoxoplasmose em pacientes imunossuprimidos e estando potencialmente associada a distúrbios neuropsiquiátricos (VIDAL, 2019; BISETEGN et al., 2023). Diante da ausência de terapias cisticidas eficazes, a estratégia de reposicionamento de fármacos (drug repurposing) emerge como uma via acelerada e economicamente viável para a descoberta de novas alternativas terapêuticas.

Nesse contexto, o Ciclopirox Olamina e a Indometacina apresentam-se como candidatos promissores com mecanismos de ação complementares. O interesse no Ciclopirox reside em seu mecanismo de quelação de ferro (PANT et al., 2025), um metal essencial para o metabolismo e replicação do *T. gondii*. Triagens recentes demonstraram que o Ciclopirox possui uma potente atividade anti-*Toxoplasma in vitro*, com um Índice de Seletividade (IS) superior a 128,3 (SANTOS et al., 2023b), o que justifica a investigação de sua eficácia *in vivo* para verificar se sua potência se traduz em redução da carga parasitária cerebral. Paralelamente, a Indometacina oferece uma abordagem singular focada na neuroproteção e imunomodulação. Por ser um anti-inflamatório com alta lipossolubilidade, ela atravessa a barreira hematoencefálica e atua como um potente vasoconstritor cerebral, reduzindo o edema e a pressão intracraniana (LUCAS, 2016; MUNJAL; ALLAM, 2024). Além de sua atividade antiparasitária direta (EC<sub>50</sub> de 8,9 µM), a Indometacina pode reverter a supressão imunológica induzida pelo parasito através da inibição da prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), restaurando a resposta imune do hospedeiro (RILEY et al., 1989; CONVIT et al., 1993a).

Portanto, a avaliação desses fármacos em modelo murino de infecção crônica é imperativa. Enquanto o Ciclopirox foca na interrupção de uma via metabólica vital do parasito, a Indometacina combina ação parasiticida com o controle da inflamação e modulação da resposta imune. A transição para ensaios *in vivo* é essencial, pois modelos de cultura celular não replicam a complexidade da barreira hematoencefálica ou a dinâmica da resposta imune sistêmica (LUCAS, 2016; HALONEN et al., 2023). Este estudo visa, assim, validar o potencial desses fármacos como alternativas ou adjuvantes terapêuticos, buscando uma estratégia mais segura e eficaz para o manejo da neurotoxoplasmose crônica.

## 5. MATERIAL E MÉTODO

### 5.1. TRIAGEM E SELEÇÃO DOS FÁRMACOS

Foi feita uma triagem inicial *in vitro* anti-*T. gondii* de fármacos dentre os 160 descritos na COVID Box (SANTOS et al., 2023b), disponibilizados pela Medicines for Malaria Venture

Organization (MMV), e também da Pandemic Response Box (PRB), contendo mais de 400 substâncias descritas (SANTOS *et al.*, 2023a).

A triagem *in vitro* dos compostos foi realizada por Santos *et al* utilizando culturas de fibroblastos de prepúcio humano (HFF) infectadas com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (cepa RH, clone 2F1) geneticamente modificados para expressar a enzima  $\beta$ -galactosidase. Para a determinação da atividade anti-*T. gondii*, as células infectadas foram expostas aos compostos e incubadas por 72 horas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A viabilidade parasitária foi quantificada através de ensaio colorimétrico, medindo-se a atividade da  $\beta$ -galactosidase pela clivagem do substrato CPRG, com leitura de absorbância em microplaca a 570 nm. Paralelamente, a citotoxicidade dos fármacos contra as células hospedeiras foi determinada incubando-se células HFF não infectadas com os tratamentos pelo mesmo período de 72 horas. A viabilidade celular foi então mensurada através do ensaio de redução do sal MTT, com posterior extração do formazan e leitura da densidade óptica a 550 nm.

A partir dessa triagem, os fármacos Ciclopirox Olamina (MMV002731) e Indometacina foram selecionados para avaliação *in vivo* neste projeto.

## 5.2. ANIMAIS E PARASITO

A cepa ME49 de *T. gondii*, utilizada para o estabelecimento da fase crônica no projeto, foi cedida pelo Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (LPz-IMT/USP). Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, 4 semanas de idade mantidos em condições de bioterismo controladas. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno com acesso *ad libitum* à água filtrada e ração comercial padrão para roedores. O ambiente foi mantido com temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C), umidade relativa de 50-60% e ciclo claro/escuro de 12 horas. As caixas continham maravalha como substrato, trocada regularmente para garantir o bem-estar animal. É importante mencionar que o uso de animais foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unifal-MG, sob o processo 0020/2024. O certificado está, em cópia, nos anexos.

## 5.3. ESTABELECIMENTO DO MODELO MURINO

Para o estabelecimento da infecção crônica *in vivo*, já foram testadas as doses de 10 cistos, 15 cistos e 20 cistos (*T. gondii*, cepa ME49) por animal (C57BL/6 fêmeas com 4 semanas de vida) sendo a primeira escolhida como a mais adequada, uma vez que não causava morte do animal e a contagem histopatológica de cistos cerebrais mostrou-se regular (em média, 35 cistos em 25 $\mu$ L de amostra), conforme já descrito por Santos *et al.* (2023a). A doença é considerada crônica a partir do dia 40, no modelo em questão. Diante disso, optou-se por iniciar o tratamento no dia 41 pós-infecção por 10 dias, uma vez ao dia as 18h via gavagem e realizar a eutanásia dos animais no dia 51 pós-infecção. Tais procedimentos foram realizados conforme descrito por

SOUZA e BELFORT JR., 2014 e WANG e SIBLEY, 2020.

A infecção foi estabelecida conforme determinação de inóculo padronizada por via oral. Para a definição das doses terapêuticas dos fármacos reposicionados e do controle positivo, utilizou-se o método de transposição de dose baseado na área de superfície corporal (BSA), considerando o peso médio humano de 60 kg e o fator de conversão para camundongos (divisão por 0,081).

Para a Indometacina, considerou-se a dose humana de 50 mg/dia (0,83 mg/kg/dia). Após a conversão ( $0,83 / 0,081$ ), obteve-se o valor de 10,29 mg/kg, sendo a dose arredondada para 10 mg/kg para o tratamento murino.

Para a Pirimetamina (controle positivo), partiu-se da dose humana de 25 mg/dia (0,42 mg/kg/dia). O cálculo de conversão ( $0,42 / 0,081$ ) resultou em 5,14 mg/kg, sendo a dose final arredondada para 5 mg/kg.

O veículo utilizado para a diluição dos fármacos consistiu em uma solução de 0,8% NaCl, 4% DMSO, 5% PEG400 e 5% Tween80. A administração foi definida em um volume de 100  $\mu$ L por animal.

O tratamento experimental foi conduzido via gavagem, utilizando-se agulha apropriada de ponta romba para garantir a deposição intragástrica direta dos compostos. As administrações ocorreram em regime de dose única diária, mantendo-se o horário fixo das 17:00 horas para minimizar variações no ciclo circadiano e no metabolismo farmacocinético dos animais.

#### 5.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos *in vivo* na fase crônica foram divididos em dois ensaios independentes para avaliação dos fármacos selecionados.

Ensaio de avaliação do Ciclopirox Olamina Neste ensaio, as doses foram definidas segundo o estudo realizado por Silva *et al.* (2019). O delineamento contou com 5 animais por grupo experimental:

- Grupo Controle Negativo: Camundongos infectados e tratados apenas com o veículo.
- Grupo Controle Positivo: Camundongos infectados e tratados com Pirimetamina (PYR) na dose de 5 mg/kg.
- Grupo Teste 1: Camundongos infectados e tratados com Ciclopirox Olamina na dose de 20 mg/kg.
- Grupo Teste 2: Camundongos infectados e tratados com Ciclopirox Olamina na dose de 40 mg/kg.

- Grupo Teste 3: Camundongos infectados e tratados com Ciclopirox Olamina na dose de 80 mg/kg.

Ensaio de avaliação da Indometacina. Neste ensaio, as doses e o veículo seguiram a padronização por transposição de dose (BSA) descrita anteriormente. O delineamento contou com 5 animais por grupo:

- Grupo Controle Negativo: Camundongos infectados e tratados apenas com o veículo.
- Grupo Controle Positivo: Camundongos infectados e tratados com Pirimetamina (PYR) na dose de 5 mg/kg.
- Grupo Teste: Camundongos infectados e tratados com Indometacina na dose de 10 mg/kg, administrada uma vez ao dia via gavagem.

Ao final do experimento (51 dias pós-infecção), todos os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>. O tecido cerebral foi cuidadosamente removido e dissecado. Um fragmento representativo foi isolado, pesado e imediatamente congelado para preservar a integridade do material genético. As amostras foram devidamente armazenadas para posterior análise de expressão gênica por meio da técnica de qRT-PCR.

## 5.5. ANÁLISE MOLECULAR E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Os detalhes relacionados à extração de DNA e RNA, além dos protocolos de qRT-PCR e *primers* utilizados, serão discutidos nessa seção.

### 5.5.1. Extração de RNA total

A extração de RNA foi feita com o kit Reliaprep RNA Tissue Miniprep System, de acordo com as orientações do fabricante PROMEGA CORPORATION, 2016, e será descrito neste tópico.

Assim como para a extração de DNA, utilizar 200µL de material cerebral macerado para cada uma das amostras analisadas. Todos os macerados foram incubados à temperatura ambiente com 500µL de tampão de lise fornecido no kit (LBA Buffer), ao qual deve adicionar 1-tioglicerol (600µL em 30mL) anteriormente à reação de extração. Após a lise, foram homogeneizadas as amostras (pipetagem 10x com p1000) e centrifugar (3 min a 12000 rpm); após essa etapa transferir o sobrenadante para um novo tubo identificado.

Adicionar 500µL de isopropanol gelado a todas as amostras, e, em seguida, homogeneizar em vórtex. Adicionar o conteúdo de todos os tubos às micro colunas fornecidas pelo kit. Encaixar essas colunas em tubos coletores identificados e centrifugar a 12000 rpm por 1 min, até que todo

o conteúdo atravessa a coluna. Descartar o líquido no tubo coletor e encaixar novamente as microcolunas aos seus respectivos tubos.

Adicionar a cada amostra 500 $\mu$ L de RNA Wash Solution (previamente diluída em etanol 95%). Centrifugar as amostras a 12000 rpm por 30 segundos.

Nesse momento, preparar a solução de DNase segundo a proporção (por amostra): 24 $\mu$ L de Yellow Core Buffer, 3 $\mu$ L de cloreto de manganês 0,9M e 3 $\mu$ L de DNase diluída em água ultrapura. Adicionar 30 $\mu$ L dessa solução diretamente sobre a coluna de cada amostra e incubar todas no cooler por 15 min.

Passado o tempo necessário, adicionar 200 $\mu$ L de Column Wash Solution (previamente diluído em etanol 95%) às microcolunas e centrifugar as amostras a 12000 rpm por 15 segundos. Após esse tempo, adicionar 500 $\mu$ L de RNA Wash Solution a cada amostra e centrifugar mais uma vez (12000 rpm por 30 segundos).

Descartar o conteúdo dos tubos coletores. Adicionar 300 $\mu$ L de RNA Wash Solution a cada microcoluna. Centrifugar as amostras a 12000 rpm por 2 min. Descartar os tubos coletores e encaixar cada microcoluna em um tubo de eluição (1,5mL).

Por fim, adicionar 30 $\mu$ L de água livre de nuclease a cada microcoluna, e centrifugar todas as amostras a 12000 rpm por 1min. Congelar o material e depois levar para a síntese de DNA complementar.

### 5.5.2. Síntese de DNA Complementar (C-DNA)

Para reação de síntese de DNA complementar (C-DNA) a partir do RNA extraído, foi utilizado o kit One-Step RT-PCR System (Invitrogen), e a reação foi feita de acordo com as instruções do fabricante. As etapas serão demonstradas neste tópico.

Preparar os dois *mix* necessários para a reação, sendo o *mix 1* composto, proporcionalmente, de 1 $\mu$ L de dntp (10mM), 1 $\mu$ L de *random primer* e 11 $\mu$ L de amostra, e o *mix 2*, de 2 $\mu$ L de DTT e 4 $\mu$ L de *buffer*.

Colocar o *mix 1* no termociclador por 5min a 65°C, sendo que, aos 4min30s de reação, retirar as amostras, colocar no *cooler* por 20s, acrescentar do *mix 2* (6 $\mu$ L) e recolocar no termociclador por 20s a 37°C. Por fim, adicionar 1 $\mu$ L da enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* a todas as amostras e retornar as mesmas para o termociclador.

Ao fim do processo, armazenar as amostras para posterior análise em qRT-PCR.

### 5.5.3. qRT-PCR

Para a reação de qRT-PCR foi utilizado o *primer* Rep529 (*forward*: 5'-GTT GGG AAG CGA CGA GAG TC-3'; *reverse*: 5'-ATT CTC TCC GCC ATC ACC AC-3'; TaqMan probe marcada com FAM: 5'-AGA AGA TGT TTC CGG CTT GGC TGC TT-3' e NFQ como quencher. A reação será proporcionalmente montada com: 3,5µL de água ultrapura, 5µL 2x Universal TaqMan *master mix*, 0,5µL “primer mix” (0,5µL Rep529F, 0,5µL Rep529R e 0,25µL probe) e 1µL de amostra. As condições de reação serão: 2 min, 50 °C, 95 °C por 10 min, então 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min.

### 5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados de carga parasitária foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 9. Inicialmente, a normalidade da distribuição dos dados em cada grupo foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homocedasticidade das variâncias entre os grupos foi verificada pelo teste de Levene. Devido à natureza exponencial da quantificação de carga parasitária por qRT-PCR e à variabilidade inerente aos dados biológicos, os valores de número de parasitos foram transformados em escala logarítmica (Log10) para estabilizar a variância e aproximar a distribuição dos dados à normalidade, conforme demonstrado pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene ( $p > 0.05$  para a maioria dos grupos após transformação).

Para a comparação entre três ou mais grupos independentes, foi empregada a Análise de Variância (ANOVA) One-way. Quando a ANOVA resultou em um p-valor inferior a 0.05, indicando a existência de diferenças significativas entre os grupos, foi realizado o Teste post-hoc de Tukey para identificar quais pares de grupos apresentavam diferenças estatisticamente significativas. Em todos os testes, um valor de  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Embora a transformação logarítmica tenha contribuído para a normalidade e homocedasticidade dos dados na maioria dos grupos, alguns grupos ainda apresentaram desvios da normalidade ( $p < 0.05$  no teste de Shapiro-Wilk) mesmo após a transformação. Em situações ideais, para dados que não atendem plenamente às premissas de normalidade, testes não paramétricos como o Kruskal-Wallis (seguido por um teste post-hoc de Dunn ou Conover) seriam alternativas mais robustas. No entanto, a ANOVA é frequentemente utilizada em estudos biológicos, especialmente quando a homocedasticidade é mantida e os desvios da normalidade não são extremos, sendo considerada razoavelmente robusta a pequenas violações da normalidade, particularmente com tamanhos amostrais semelhantes entre os grupos. A escolha pela ANOVA e Tukey foi mantida para consistência com a prática comum na área e para permitir

a comparação direta com estudos similares que empregam essa abordagem.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

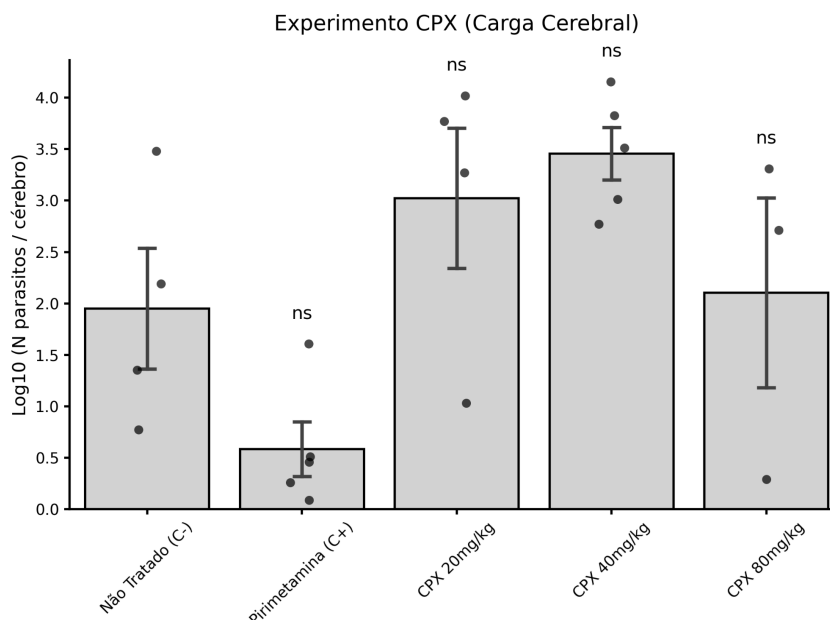
### 6.1. ENSAIOS *IN VITRO* DA CICLOPIROX OLAMINA E INDOMETACINA

A seleção do Ciclopirox Olamina e da Indometacina para as etapas experimentais subsequentes fundamentou-se substancialmente em seus promissores perfis de eficácia *in vitro* e em seus mecanismos de ação complementares. Durante as triagens preliminares realizadas por Santos *et al* em 2023, o Ciclopirox Olamina destacou-se por sua potente atividade antiparasitária direta, impulsionada por sua capacidade de quelar o ferro celular, apresentando uma Concentração Efetiva Média (EC50) de  $389,6 \pm 130$  nM contra taquizoítos da cepa RH. Aliado a isso, a baixa citotoxicidade do composto frente às células hospedeiras ( $CC50 > 50$   $\mu$ M) conferiu-lhe um Índice de Seletividade (IS) superior a 128,3, indicando uma ampla e segura janela terapêutica em modelo celular. De forma paralela, a Indometacina também demonstrou atividade antiparasitária relevante nos ensaios celulares, registrando uma EC50 de 8,9  $\mu$ M. Embora possua uma potência *in vitro* numericamente menor que o Ciclopirox, a seleção da Indometacina justificou-se fortemente por suas propriedades físico-químicas e imunomoduladoras, como a alta lipossolubilidade ( $\log P = 4,27$ ), que facilita a transposição da barreira hematoencefálica, e sua capacidade de inibir a via da prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), oferecendo um potencial neuroprotetor crucial para o manejo da infecção no sistema nervoso central. Em conjunto, esses robustos parâmetros *in vitro* e atributos farmacodinâmicos consubstanciaram o avanço de ambas as moléculas para a avaliação de eficácia no modelo murino de toxoplasmose crônica.

### 6.2. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA *IN VIVO* DO CICLOPIROX OLAMINA NA TOXOPLASMOSE CRÔNICA

Para avaliar a eficácia do tratamento, a carga parasitária de *Toxoplasma gondii* nos tecidos cerebrais dos animais foi quantificada por qRT-PCR em tempo real. Os valores de Ciclo Limiar (Ct) foram convertidos para o número de parasitos e, subsequentemente, transformados em escala logarítmica (Log10) para estabilizar a variância e permitir uma análise estatística e visual mais robusta, conforme representado na Figura 4.

Figura 4: Carga parasitária cerebral em Log<sub>10</sub> (N parasitos/cérebro) nos diferentes grupos de tratamento. As barras representam a média e o erro padrão da média (SEM). Pontos individuais indicam os valores de cada animal. Análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey HSD não revelou diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0.05$ ).



Os resultados confirmam a eficácia da Pirimetamina (PYR 5mg/kg), utilizada como controle positivo, que induziu a uma acentuada redução da carga parasitária em comparação com o grupo não tratado (NT), validando o modelo experimental (DUNAY et al., 2018).

Em contrapartida, o tratamento com Ciclopirox Olamina (CPX) apresentou um comportamento complexo e dependente da dose. As doses de 20 mg/kg e 40 mg/kg resultaram em uma carga parasitária média superior à do grupo controle não tratado. Contudo, observou-se uma notável inversão dessa tendência na dose de 80 mg/kg, na qual a carga parasitária média foi reduzida, aproximando-se dos níveis observados no grupo controle. Apesar desta aparente dose-resposta, a análise de variância (ANOVA) não detectou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $F(4, 19) = 2.25$ ,  $p = 0.0862$ ). A ausência de significância estatística pode ser atribuída à alta variabilidade biológica intra-grupo, um fator comum em modelos de infecção crônica.

Embora o Ciclopirox tenha demonstrado atividade anti-*T. gondii* *in vitro* em estudos prévios (NEVILLE et al., 2015), atribuída ao seu mecanismo de quelatação de ferro (PANT et al., 2025), os resultados do presente estudo sugerem que sua eficácia *in vivo* é limitada nas condições testadas. Uma possível explicação para a discrepância entre os resultados *in vitro* e *in vivo* reside na farmacocinética e biodisponibilidade do Ciclopirox. Sendo primariamente um agente tópico

(ABRAMS et al., 1991), a administração sistêmica pode não ter atingido concentrações terapêuticas sustentadas no sistema nervoso central, um santuário para o parasita na fase crônica.

Além da dependência do mecanismo de quelação de ferro, evidências recentes ampliam a compreensão sobre a atividade pleiotrópica e a potencial toxicidade sistêmica do Ciclopirox Olamina. Um estudo conduzido por Yuan *et al.* (2025) demonstrou que o fármaco atua como um potente agonista da piroptose, promovendo a morte celular por meio da ativação do inflamassoma NLRP3 e do aumento abrupto na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Embora esse estresse oxidativo seja explorado estrategicamente no reposicionamento oncológico para a eliminação de células tumorais, no contexto do tratamento da toxoplasmose, esse mesmo mecanismo pode exacerbar a citotoxicidade nas células saudáveis do hospedeiro. Essa indução de morte celular inflamatória corrobora fortemente a hipótese de que a janela terapêutica do fármaco leva ao aparecimento de toxicidade sistêmica antes que concentrações antiparasitárias efetivas sejam mantidas no sistema nervoso central.

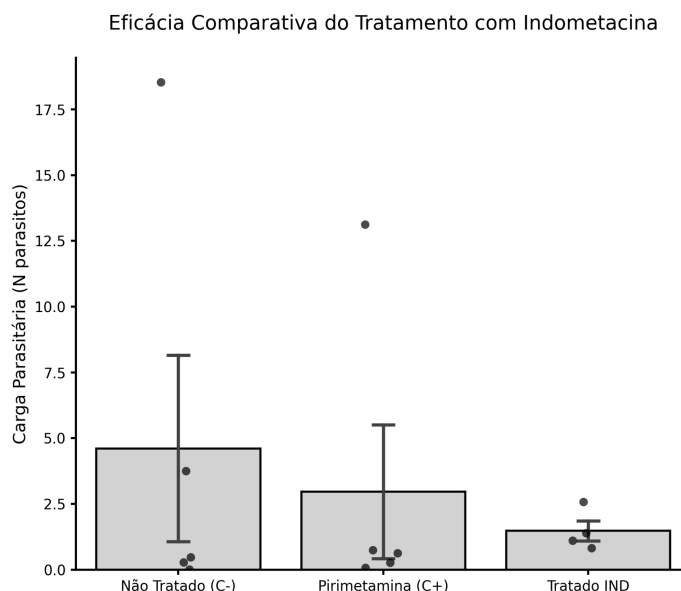
Em conclusão, enquanto a Pirimetamina demonstrou a eficácia esperada, o Ciclopirox, nas doses de 20 e 40 mg/kg, não se mostrou eficaz. No entanto, a tendência de redução da carga parasitária observada na dose de 80 mg/kg é um achado relevante, que sugere que o potencial terapêutico do CPX não deve ser completamente descartado. Estudos futuros são necessários para otimizar o regime terapêutico, explorando doses superiores a 80 mg/kg, diferentes vias de administração ou formulações que melhorem a sua biodisponibilidade no sistema nervoso central, a fim de elucidar se o efeito dose-dependente observado pode se traduzir em eficácia estatisticamente significativa.

### 6.3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA *IN VIVO* DA INDOMETACINA NA TOXOPLASMOSE CRÔNICA

O delineamento experimental para a avaliação *in vivo* da Indometacina (IND) foi estabelecido conforme descrito na metodologia, utilizando doses de 10 mg/kg por dia baseadas na transposição de dose por área de superfície corporal. A escolha deste fármaco foi fundamentada em dados preliminares *in vitro*, que demonstraram uma EC<sub>50</sub> de 8,9 µM, além de suas propriedades farmacológicas de atravessar a barreira hematoencefálica e reduzir o edema cerebral, características desejáveis para o tratamento da neurotoxoplasmose crônica.

A quantificação da carga parasitária de *Toxoplasma gondii* nos tecidos dos animais foi realizada por qRT-PCR em tempo real. Os valores obtidos foram expressos como número absoluto de parasitos para uma interpretação direta da carga parasitária. A Figura 5 apresenta a comparação entre o grupo não tratado (Controle Negativo, C-), o grupo tratado com Pirimetamina (Controle Positivo, C+) e o grupo tratado com Indometacina (Tratado IND).

Figura 5: Carga parasitária (N parasitos) em camundongos infectados. Comparação entre grupos Não Tratado (C-), Pirimetamina (C+) e Tratado IND. As barras representam a média e o erro padrão da média (SEM). Pontos individuais indicam os valores de cada animal. A análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey HSD não revelou diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre os grupos.



Os resultados indicam que o grupo Não Tratado (C-) apresentou uma carga parasitária média de aproximadamente 4.61 parasitos. O grupo tratado com Pirimetamina (C+) exibiu uma carga média de cerca de 2.88 parasitos, enquanto o grupo Tratado IND apresentou uma carga média de aproximadamente 1.48 parasitos. Apesar das diferenças numéricas observadas, a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey HSD não revelou diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre nenhum dos grupos comparados. É importante notar a alta variabilidade individual, especialmente no grupo Não Tratado, com um animal apresentando uma carga parasitária consideravelmente elevada (~18.5 parasitos), e no grupo Pirimetamina, com um animal em ~13.1 parasitos, o que contribui para a ausência de significância estatística.

A escolha da Indometacina transcendeu a sua modesta atividade parasiticida direta, focando-se em seu reconhecido potencial imunomodulador. A literatura científica aponta que a via da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e da prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) é frequentemente explorada pelo *Toxoplasma gondii* como um mecanismo de evasão para suprimir a resposta imune do hospedeiro e facilitar sua replicação. A inibição da COX-2 demonstrou reduzir a carga parasitária de *T. gondii* e fortalecer a resposta imune pró-inflamatória, um efeito que é revertido pela adição de PGE<sub>2</sub> exógena. Essa modulação da resposta imune já foi sugerida em outras infecções parasitárias, como na malária e na leishmaniose, reforçando a hipótese de que a Indometacina possa atuar não como um agente parasiticida primário, mas como um adjuvante terapêutico que

restaura a capacidade do sistema imune de controlar a infecção.

O reposicionamento da indometacina revela-se ainda mais estratégico quando se considera o principal grupo de risco para a reativação da neurotoxoplasmose: pacientes imunossuprimidos vivendo com HIV. Além do seu papel imunomodulador na infecção parasitária, evidências indicam que o fármaco possui atividade direta sobre os reservatórios virais. Um estudo conduzido por Sampath *et al.* (2017) demonstrou que a indometacina atua farmacologicamente no aumento da expressão da proteína procaspase 8 em células T CD4. No contexto da reativação do HIV, isso culmina na morte das células infectadas e na redução significativa dos níveis de DNA viral latente. Diante da toxicidade frequentemente compartilhada entre a terapia antirretroviral e os antiparasitários convencionais, a indometacina emerge como uma candidata terapêutica de duplo benefício para casos de coinfeção, auxiliando simultaneamente no controle do ambiente pró-inflamatório contra o *T. gondii* e na supressão do HIV.

Os resultados obtidos neste ensaio, embora não estatisticamente significativos, revelam uma tendência biológica de redução da carga parasitária no grupo tratado com Indometacina, que apresentou a menor carga parasitária média entre os três grupos. A ausência de significância estatística pode ser atribuída, em parte, à alta variabilidade observada nos grupos, especialmente no grupo controle não tratado, bem como ao tamanho amostral limitado (n=5 por grupo). A presença de valores discrepantes, como o animal com carga parasitária excepcionalmente alta no grupo controle, pode ter mascarado um efeito real do fármaco.

Em comparação com o Ciclopirox Olamina, que em doses mais baixas (20 e 40 mg/kg) chegou a apresentar cargas parasitárias médias superiores ao controle, a Indometacina demonstrou um perfil mais consistente de redução. Isso sugere que, mesmo sem significância estatística, a Indometacina pode ter um papel mais promissor como coadjuvante terapêutico. Estudos futuros deverão focar em aumentar o poder estatístico do ensaio, utilizando um maior número de animais, e aprofundar a investigação dos mecanismos imunomoduladores da Indometacina no contexto da neurotoxoplasmose crônica, a fim de verificar se a atividade anti-inflamatória e imunomoduladora se traduz em uma redução estatisticamente significativa da carga cística *in vivo*.

## 7. CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou a aplicação de um modelo murino de infecção crônica com a cepa ME49 de *Toxoplasma gondii* e a utilização da técnica de qRT-PCR para a quantificação precisa da carga parasitária cerebral, demonstrou-se adequado para a avaliação da eficácia terapêutica de fármacos candidatos.

O Ciclopirox Olamina, apesar de sua elevada atividade anti-*Toxoplasma gondii* *in vitro*, não

apresentou eficácia terapêutica significativa *in vivo* nas doses avaliadas, indicando limitações relacionadas à farmacocinética, biodisponibilidade e/ou penetração no sistema nervoso central. A tendência de redução da carga parasitária observada na maior dose do Ciclopirox sugere que ajustes de formulação, dose ou estratégia de administração podem ser necessários para potencializar sua eficácia *in vivo*.

A Indometacina demonstrou um efeito biológico favorável, promovendo redução da carga parasitária cerebral, embora sem significância estatística, possivelmente devido à elevada variabilidade biológica e ao tamanho amostral limitado. Os resultados obtidos para a Indometacina reforçam seu potencial como agente adjuvante terapêutico, atuando não apenas por efeito antiparasitário direto, mas também por mecanismos imunomoduladores, anti-inflamatórios e neuroprotetores.

A discrepância entre os resultados *in vitro* e *in vivo* evidencia a importância de considerar aspectos farmacocinéticos e fisiológicos na translação de candidatos a fármacos para modelos experimentais mais complexos. Os dados obtidos indicam que estratégias combinadas, envolvendo reposicionamento de fármacos com diferentes mecanismos de ação, podem representar uma abordagem promissora no tratamento da toxoplasmose crônica. Estudos futuros com maior poder estatístico, avaliação de toxicidade, otimização de dose e formulação, bem como investigação de terapias combinadas, são necessários para confirmar e expandir os achados deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

ABRAMS, Beatrice B. *et al.* Ciclopirox olamine: a hydroxypyridone antifungal agent. **Clinics In Dermatology**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 471-477, out. 1991. Elsevier BV.

[http://dx.doi.org/10.1016/0738-081x\(91\)90075-v](http://dx.doi.org/10.1016/0738-081x(91)90075-v).

AGUIAR, Anna Caroline Campos *et al.* Discovery of Marinoquinolines as Potent and Fast-Acting Plasmodium falciparum Inhibitors with *in vivo* Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 13, p. 5547–5568, 2018.

ALONSO AGUIRRE, A. *et al.* Transdisciplinary and social-ecological health frameworks—Novel approaches to emerging parasitic and vector-borne diseases. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 4, p. e00084, 1 Feb 2019.

BANNWARTH, B.; NETTER, P.; LAPICQUE, F. *et al.* Concentrações plasmáticas e no líquido cefalorraquidiano de indometacina em humanos. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 38, p. 343–346, 1990.

BARROS, João Luís Vieira Monteiro de *et al.* Is there any association between *Toxoplasma gondii* infection and bipolar disorder? A systematic review and meta-analysis. **Journal of affective disorders**, v. 209, p. 59–65, 1 Feb 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27889597/>>. Acesso em: 8 nov 2021.

BAYANI, Masomeh *et al.* *Toxoplasma gondii* infection and risk of Parkinson and Alzheimer diseases: A systematic review and meta-analysis on observational studies. **Acta tropica**, v. 196, p. 165–171, 1 Ago 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31102579/>>. Acesso em: 8 nov 2021.

BIGNA, J. J. *et al.* Global, regional, and country seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1, p. 1–10, jul. 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-69078-9

BISETEGN, H. *et al.* Global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among patients with mental and neurological disorders: A systematic review and meta-analysis. **Health Science Reports**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. e1319, 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Guia de Vigilância em Saúde**. 6. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2024.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. DPDx - **Toxoplasmosis**. 2019. 1 ilustração. Disponível em: [cdc.gov](https://www.cdc.gov). Acesso em: 20 abr. 2026.

COLOMBO, Fabio A. *et al.* Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: Importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5044–5047, 2005.

CONVIT, J. *et al.* Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. **The Lancet**, v. 342, n. 8868, p. 402–405, 1993a.

CONVIT, J. *et al.* The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 444–448, 1993b.

DA SILVA, M. *et al.* Promising Drug Targets and Compounds with Anti-*T. gondii* Activity. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 14, n. 10, p. 1001–1025, out. 2021. DOI:10.3390/microorganisms9091960

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii*: the first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [S. l.], v. 55, n. 6, p. 467-475, nov. 2008. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x

DUNAY, Ildiko Rita *et al.* Treatment of Toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 31, n. 4, art. e00057-17, out. 2018.

DUNAY, I. R.; DIEFENBACH, A.. Group 1 innate lymphoid cells in *Toxoplasma gondii* infection. **Parasite Immunology**, [S.L.], v. 40, n. 2, 29 jan. 2018. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/pim.12516>.

DUNNE, R. L. et al. Ciclopirox Olamine: A Novel Agent for the Treatment of Trichomoniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 11, p. 7115-7117, 2015. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01525-15>. Acesso em: 5 jan. 2026.

DUBEY, Jitender P. The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467-475, 2008.

ELSHEIKHA, Hany M. *et al.* Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis, and Management of Cerebral Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 34, n. 1, 16 dez. 2020. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00115-19>.

FIALHO, Cristina Germani. **Modelo Hamster (*Mesocricetus auratus waterhouse, 1839*) para estudo da toxoplasmose congênita**. 2009. 162 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

FLEGR, Jaroslav. How and why *Toxoplasma* makes us crazy. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 4, p. 156-163, 1 Abr 2013. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S1471492213000202/fulltext>>. Acesso em: 8 nov 2021.

HALONEN, S. K. *et al.* Use of *in vitro* derived human neuronal models to study host-parasite interactions of *Toxoplasma gondii* in neurons and neuropathogenesis of chronic toxoplasmosis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 13, p. 1129451, 2023.

HOMAN, W. L. et al. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Note: Nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to GenBank™ database with the accession number AF146527 (*Toxoplasma gondii* genomic repetitive 529 bp fragment).1. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 69-75, 1 jan. 2000.

JOSÉ RODRIGUES COURA. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. [s.l.] Rio De Janeiro Guanabara Koogan, 2013.

JOURDAN, Jean-Pierre *et al.* Drug repositioning: a brief overview. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [S.L.], v. 72, n. 9, p. 1145-1151, 1 set. 2020.

JUE, S.G. *et al.* Ciclopirox Olamine 1% Cream A Preliminary Review of its Antimicrobial Activity and Therapeutic Use. **Drugs**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 330-341, abr. 1985. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.2165/00003495-198529040-00002>.

KAISER, M. *et al.* Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning. **PLOS One**, v. 10, n. 8, p. e0135556, 2015. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0135556>. Acesso em: 5 jan. 2026.

KONSTANTINOVIC, N. *et al.* Treatment of toxoplasmosis: Current options and future perspectives. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 15, jun. 2019. DOI:10.1016/j.fawpar.2019.e00036

LIU, Quan *et al.* Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 28 Mai 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26017718/>>. Acesso em: 21 nov 2021.

LU, J. M. *et al.* Lactoferrin-modified nanoemulsions enhance brain-targeting and therapeutic efficacy against *Toxoplasma gondii*-induced neuronal injury. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 22, n. 1, p. 150-168, mar. 2024. DOI:10.1016/j.ijpddr.2024.100575

LUCAS, Sylvia. The Pharmacology of Indomethacin. **Headache: The Journal of Head and Face Pain**, v. 56, n. 2, p. 436-446, fev. 2016.

MARCIANO, Maria Aparecida Moraes *et al.* Determination of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts by PCR real-time after treatment with propidium monoazide. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 62, p. e84, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33146312/>>. Acesso em: 1 nov 2022.

MARRA, Christina M. Central nervous system infection with *Toxoplasma gondii*. **Handbook of clinical neurology**, v. 152, p. 117–122, 1 Jan 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29604970/>>. Acesso em: 11 nov 2021.

MARTYNOWICZ, J *et al.* Efficacy of guanabenz combination therapy against chronic toxoplasmosis across multiple mouse strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 9, e00539-20, 2020.

MCFARLAND, Madalyn M. *et al.* Review of Experimental Compounds Demonstrating Anti-Toxoplasma Activity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. 7017 – 7034, 1 Dez 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27600037/>>. Acesso em: 16 nov 2021.

MCARTHUR, J. C.; BREW, B. J.; NATH, A. Neurological complications of HIV infection. **The Lancet Neurology**, v. 4, n. 9, p. 543–555, set. 2005.

MILNE, Gregory; WEBSTER, Joanne P.; WALKER, Martin. *Toxoplasma gondii*: An Underestimated Threat? **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 12, p. 959–969, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.08.005>>.

MINKUS, Caroline L. *et al.* Real-Time Multiplex PCR Analysis in Infectious Uveitis. **Seminars In Ophthalmology**, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 252-255, 19 maio, 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/08820538.2019.1620803>.

MONTAZERI, Mahbobeh *et al.* A systematic review of *in vitro* and *in vivo* activities of anti-toxoplasma drugs and compounds (2006-2016). **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, 2017.

MORAIS, V. T. Perfil epidemiológico da toxoplasmose em gestantes no Brasil: análise do período 2019-2024. **Revista Contribuciones a las Ciencias Sociales**, São José dos Pinhais, v. 18, n. 12, p.

1-19, dez. 2025. DOI:<https://doi.org/10.55905/revconv.18n.12-328>

MUNJAL A, ALLAM AE. Indomethacin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**; 2024 May 28. PMID: 32310396.

NEU, Natalie *et al.* TORCH Infections. **Clinics In Perinatology**, [S.L.], v. 42, n. 1, p. 77-103, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clp.2014.11.001>.

NEVILLE, A. J. *et al.* Clinically Available Medicines Demonstrating Anti-Toxoplasma Activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 59, n. 12, p. 7161–7169, 2015.

NIEWERTH, M. *et al.* Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding iron-binding proteins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 47, n. 6, p. 1805-1817, jun. 2003. DOI:10.1128/AAC.47.6.1805-1817.2003

NISSAPATORN, Veeranoot; SAWANGJAROEN, Nongyao. Parasitic infections in HIV infected individuals: diagnostic & therapeutic challenges. **The Indian journal of medical research**, v. 134, n. 6, p. 878–897, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22310820/>>.

OLIVEIRA, R. M. *et al.* Novel drug candidates targeting *Toxoplasma gondii* in the era of drug repurposing. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 16, art. 1673462, p. 1-15, fev. 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1673462>

PANT, A. *et al.* Ciclopirox suppresses poxvirus replication by targeting iron metabolism. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 221, p. 105777, 2025.

PEREIRA, A. C. A. *et al.* Cyclooxygenase (COX)-2 Inhibitors Reduce *Toxoplasma gondii* Infection and Upregulate the Pro-inflammatory Immune Response in *Calomys callosus* Rodents and Human Monocyte Cell Line. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 225, 2019.

PINTO-FERREIRA, Fernanda *et al.* Patterns of Transmission and Sources of Infection in Outbreaks of Human Toxoplasmosis. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 12, p. 2177–2182, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31742524/>>. Acesso em: 8 nov 2021.

PITTMAN, Kelly J.; KNOLL, Laura J. Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* during Acute and Chronic Infections. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 79, n. 4, p. 387–401, Dez 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26335719/>>. Acesso em: 8 nov 2021.

PROMEGA CORPORATION. ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System Instructions for Use of Products Z6110, Z6111 and Z6112. p. 1–19, 2016. Disponível em: <[www.promega.com](http://www.promega.com)>.

RAMOS, Amanda Bruno da Silva Bellini. **Padronização de modelos *in vivo* e rt-qpcr para avaliação da eficácia de compostos anti *Toxoplasma gondii***. 2023. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2023.

RAMOS, B. *et al.* Repurposing the Medicines for Malaria Venture's COVID Box to discover potent inhibitors of *Toxoplasma gondii*, and *in vivo* efficacy evaluation of almitrine bismesylate (MMV1804175) in chronically infected mice. **PLoS one**, v. 18, n. 7, p. e0288335–e0288335, 7 jul. 2023.

REATTI, Mariane Maria Paschoalin; GUERRA, Taís de Leon. **Indometacina enquanto fármaco**

**de reposicionamento em toxoplasmose experimental.** 2025. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2025. Disponível em: <https://repositorio.unifal-mg.edu.br/handle/123456789/3238>. Acesso em: 5 jan. 2026.

RESEARCH NESTER. **Toxoplasmosis Treatment Market Size & Share**, Growth Report 2035. New York: Research Nester, 2025.

RILEY, E. M. *et al.* The influence of anti-inflammatory and immunosuppressive drugs on the development of immunity to malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 179-180, 1989.

RILEY, E. M. *et al.* Suppression of *in vitro* lymphoproliferative responses in acute malaria patients can be partially reversed by indomethacin. **Parasite Immunology**, v. 11, n. 5, p. 509-517, set. 1989.

SADEGHI, Maryam *et al.* An updated meta-analysis of the association between *Toxoplasma gondii* infection and risk of epilepsy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 8, p. 453–462, 1 Ago 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31034025/>>. Acesso em: 8 nov 2021.

SANTOS, Bruna Ramos dos *et al.* Anti-*Toxoplasma gondii* screening of MMV pandemic response box and evaluation of RWJ-67657 efficacy in chronically infected mice. **Parasitology**, [S.L.], v. 150, n. 13, p. 1226-1235, 20 out. 2023a. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0031182023000999>.

SANTOS, Bruna Ramos dos *et al.* Repurposing the Medicines for Malaria Venture's COVID Box to discover potent inhibitors of *Toxoplasma gondii*, and *in vivo* efficacy evaluation of almitrine bismesylate (MMV1804175) in chronically infected mice. **Plos One**, [S.L.], v. 18, n. 7, p. 1-16, 7 jul. 2023b. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0288335>

SANTOS, Mike dos *et al.* Medicines for Malaria Venture Pandemic Box *In Vitro* Screening Identifies Compounds Highly Active against the Tachyzoite Stage of *Toxoplasma gondii*. **Tropical Medicine And Infectious Disease**, [S.L.], v. 8, n. 12, p. 510, 29 nov. 2023c. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/tropicalmed8120510>.

SENGUPTA, P. P. *et al.* Exploration of global trends of seroprevalence of human toxoplasmosis by scientometric analysis. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 275, art. 108971, p. 1-12, jun. 2025. DOI: 10.1016/j.exppara.2025.108971

SHAMMAA, A. M.; POWELL, T. G.; BENMERZOUGA, I. Adverse outcomes associated with the treatment of *Toxoplasma* infections. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1035, 13 jan. 2021.

SHEN, T.; HUANG, S. Repositioning the old fungicide ciclopirox for new medical uses. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 28, p. 4350-4358, 2016.

SIQUEIRA-BATISTA, Rodrigo *et al.* **Parasitologia: fundamentos e prática clínica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020.

SYKES, M. L. *et al.* Development and application of a sensitive, phenotypic high-content assay to identify compounds with anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, n. 2, p. 116-125, 2015.

SYKES, M. L. *et al.* Impact of Laboratory-Adapted Intracellular *Trypanosoma cruzi* Strains on the Activity Profiles of Compounds with Anti-*T. cruzi* Activity. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 476, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/2/476>. Acesso em: 5 jan. 2026.

SONTHALIA, S. Topical Ciclopirox Olamine 1%: Revisiting a Unique Antifungal. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 10, n. 4, p. 451-456, 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6615394/>. Acesso em: 5 jan. 2026.

SOUZA, Adriane *et al.* Taxa de mortalidade por toxoplasmose por regiões brasileiras: um estudo retrospectivo do período de 2009-2018. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research-BJSCR**, v. 33, n. 2, p. 24 – 29, 2020. Disponível em: <http://www.mastereditora.com.br/bjsr>>. Acesso em: 14 nov 2021.

SOUZA, Wanderley De; BELFORT JR., Rubens. **Toxoplasmose & *Toxoplasma gondii***. [S.l: s.n.], 2014.

STEL, Vianda S. *et al.* Survival Analysis I: The Kaplan-Meier Method. **Nephron Clinical Practice**, v. 119, n. 1, p. c83 – c88, Ago 2011. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/324758>>. Acesso em: 21 nov 2021.

SUBISSI, A. *et al.* Ciclopirox: recent nonclinical and clinical data relevant to its use as a topical antimycotic agent. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 12, p. 1385-1399, 2010.

SWIERZY, Izabela J. *et al.* *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells: a critical interplay for food-borne parasite transmission. **International journal for parasitology**, v. 44, n. 2, p. 91–98, Fev 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24184158/>>. Acesso em: 8 nov 2021.

TORGERSON, P. R. *et al.* The future burden of congenital Toxoplasmosis in Africa under demographic and climate change. **bioRxiv**, [S. l.], p. 1-25, set. 2025. DOI:<https://doi.org/10.1101/2025.09.04.674311>

VIDAL, José E. *et al.* PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p.4765–4768, 2004.

VIDAL, J. E. HIV-Related Cerebral Toxoplasmosis Revisited: Current Concepts and Controversies of an Old Disease. **Journal of the International Association of Providers of AIDS Care (JIAPAC)**, v. 18, p. 232595821986731, jan. 2019.

VILLARD, O. *et al.* Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, n. 1, p. 22–33, jan. 2016.

WANG, Qiuling; SIBLEY, L. David. Assays for Monitoring *Toxoplasma gondii* Infectivity in the Laboratory Mouse. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 99-116, 23 nov. 2020. Springer US. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-9857-9\\_5](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-9857-9_5)..

WEI, Hai Xia *et al.* A systematic review and meta-analysis of the efficacy of anti- *Toxoplasma gondii* medicines in humans. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 4–11, 2015.

YUAN, H. *et al.* Ciclopirox, a broad-spectrum antifungal drug, moonlights as a pyroptosis agonist to drive hepatocellular carcinoma cell death. **Eur J Pharmacol**, v. 1008, p. 178358, 5 dez. 2025. DOI: 10.1016/j.ejphar.2025.178358. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41242597/>.

## ANEXOS

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

# Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da eficácia da ciclopilox olamina no tratamento da Toxoplasmose cerebral crônica in vivo**, registrada com o nº **0020/2024**, sob a responsabilidade de **Marcos José Marques**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **30/08/2024 a 11/08/2025**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Camundongo / C57bl6	35	0	35	Centro de bioterismo da unifal-mg

Alfenas, 20 de Agosto de 2024

**Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira**  
Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidade/certificado/> e digite a chave: 9689c227c7bbb0c377dade7df68dfac