

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**DISSELENETO DE DIFENILA E SELENITO DE SÓDIO
ASSOCIADO À TRIMETOPRIMA E
SULFAMETOXAZOL EM TOXOPLASMOSE
EXPERIMENTAL: INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE DE
BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E
MODULAÇÃO DE CITOCINAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cleber Francisco Barbosa

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**DISSELENETO DE DIFENILA E SELENITO DE SÓDIO ASSOCIADO À
TRIMETOPRIMA E SULFAMETOXAZOL EM TOXOPLASMOSE
EXPERIMENTAL: INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE DE BIOMARCADORES
DE ESTRESSE OXIDATIVO E MODULAÇÃO DE CITOCINAS**

Cleber Francisco Barbosa

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Veterinária, Área de Concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Mario Luiz de La Rue

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DISSELENETO DE DIFENILA E SELENITO DE SÓDIO ASSOCIADO À
TRIMETOPRIMA E SULFAMETOXAZOL EM TOXOPLASMOSE
EXPERIMENTAL: INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE DE BIOMARCADORES
DE ESTRESSE OXIDATIVO E MODULAÇÃO DE CITOCINAS**

**elaborada por
Cleber Francisco Barbosa**

**como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia**

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Mario Luiz De La Rue, PhD. (UFSM)
(Presidente/Orientador)**

**Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
(Examinadora)**

**Dr. Gustavo Thomé
(Examinador)**

Santa Maria, Dezembro de 2014.

Dedico meu mestrado às pessoas mais importantes da minha vida:

Minha esposa, meu grande amor, Aline;

Meus pais, Arlei e Floraci;

A minha família, em especial ao meu irmão Cleiton (in memoriam).

“Vocês sempre serão a força para que eu continue lutando”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, pelas oportunidades a min concedidas.

Agradeço a minha família, minha esposa Aline, meu grande amor. Sem você nada teria sentido, nada eu teria conquistado. Agradeço aos meus pais, Arlei e Floraci, pelos ensinamentos, pela educação, pelo exemplo de vida, por todos incentivos e sacrifícios que sempre sem medir esforços dispensaram a min, fazendo com que seguisse o caminho da simplicidade e do bem. Agradeço em especial ao meu irmão, Cleiton, (*in memoriam*) simplesmente por me ensinar o significado da palavra amor. Vocês são a minha vida.

Agradeço de maneira especial ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Luiz de La Rue, por todos seus ensinamentos durante essa trajetória, sem sua confiança seria impossível a conquista deste grande sonho. Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM); ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia (UFSM).

Finalizo agradecendo, de maneira mais do que especial ao meu grande amigo Prof. Dr. Alexandre Alberto Tonin. Meu amigo, muito obrigado por todo o conhecimento compartilhado, pelo ensinamento dispensado, pela amizade, simplicidade, paciência e, principalmente, por toda dedicação, comprometimento e a ajuda incondicional durante o meu mestrado.

“a persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

DISSELENETO DE DIFENILA E SELENITO DE SÓDIO ASSOCIADO À TRIMETOPRIMA E SULFAMETOXAZOL EM TOXOPLASMOSE EXPERIMENTAL: INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E MODULAÇÃO DE CITOCINAS

AUTOR: CLEBER FRANCISCO BARBOSA

ORIENTADOR: MARIO LUIZ DE LA RUE

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 18 de Dezembro de 2014.

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição geográfica mundial, causada por *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório, podendo apresentar, em determinadas regiões, grande impacto médico- veterinário; sendo considerada uma das enfermidades infecciosas mais difundidas dentre as transmissíveis. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da associação entre trimetoprima e sulfametoxazol (ST) com disseleneto de difenila (DPDS) e selenito de sódio (SSe) em um modelo experimental de toxoplasmose, sobre biomarcadores de estresse oxidativo e nos níveis de citocinas. Portanto, este estudo avaliou os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), produtos avançados de oxidação de proteínas (AOPP) e a atividade da glutathione redutase (GR), assim como a modulação da resposta inflamatória por meio da avaliação dos níveis de INF- γ e IL-10. Para estes fins, oitenta e quatro camundongos BALB/c adultos, machos, foram utilizados. Estes foram divididos em sete grupos, onde o grupo A serviu como controle negativo. Os animais dos grupos B ao G foram infectados intraperitonealmente com 1.2×10^7 taquizoítos (cepa RH). Destes, o grupo B representou o controle positivo; enquanto que os grupos C a G representaram os grupos de tratamento, como definido a seguir: grupo C: infectados com *T. gondii* e tratados com ST; grupo D: infectados com *T. gondii* e suplementados com SSe; grupo E: infectados com *T. gondii* e suplementados com DPDS; grupo F: infectados com *T. gondii* e tratados com ST associada a SSe; e grupo G: infectados com *T. gondii* e tratados com ST associado ao DPDS. As amostras de sangue e de fígado foram coletadas e analisadas nos dias 4 e 20 pós-infecção (pi). Como resultado foi possível observar que os níveis de TBARS aumentaram significativamente ($P < 0,05$) nos grupos B, C e F no dia 4 pi, ao mesmo tempo que os níveis deste mesmo biomarcador foram reduzidos ($P < 0,05$) nos grupos C, F e G no dia 20 pi, quando esses dados foram comparados com o grupo A. Os níveis de AOPP aumentaram significativamente ($P < 0,001$) nos grupos C e G no dia 4 do pi, ao passo que os níveis desse biomarcador foram reduzidos nos grupos C, F e G ($P < 0,001$) no dia 20 pi, quando comparado com o grupo A. Adicionalmente, a atividade de GR aumentou significativamente ($P < 0,01$) no dia 4 pi no grupo G, quando este foi comparado com o grupo controle. Os níveis de INF- γ aumentaram significativamente ($P < 0,001$) em ambos os períodos, no dia 4 (grupos B, C, F e G) e 20 pi (grupos C, F e G), quando comparado ao grupo A. Os níveis de IL-10 estavam significativamente reduzidos ($P < 0,001$) no dia 4 pi no grupo B, enquanto que no mesmo período este estava aumentado ($P < 0,001$) nos grupos C e G, quando comparado com o grupo A. No dia 20 pi os níveis de IL-10 estavam aumentados ($P < 0,001$) nos grupos F e G, quando comparado com o grupo controle. Desta maneira, nossos resultados evidenciaram que as formas inorgânica (Selenito de sódio) e orgânica (disseleneto de difenila) de selênio quando associadas com a quimioterapia foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica e oxidação de proteína, principalmente durante a fase aguda da infecção experimental, assim como proporcionou um balanço imunológico entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, evitando assim a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias.

Palavras-chave: toxoplasmose; compostos de selênio; peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, citocinas.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

DIPHENYL DISELENIDE AND SODIUM SELENITE ASSOCIATED WITH TRIMETOPRIMA AND SULFAMETOXAZOL IN EXPERIMENTAL TOXOPLASMOSIS: INFLUENCE ON OXIDANT/ANTIOXIDANT BIOMARKERS AND CYTOKINE MODULATION

AUTHOR: CLEBER FRANCISCO BARBOSA

ADVISER: MARIO LUIZ DE LA RUE

Defense Place and Date: Santa Maria, Dezember 18th, 2014.

Toxoplasmosis is a zoonosis of worldwide geographic distribution, caused by *Toxoplasma gondii*, an obligate intracellular protozoan with, in certain regions, high-impact medical-veterinary; being considered one of the most widespread infectious diseases. The aim of this study was to assess the effect of sulfamethoxazole and trimethoprim (ST) associated with diphenyl diselenide (DPDS) and sodium selenite (SSe) in experimental toxoplasmosis, on oxidant/antioxidant biomarkers and cytokine levels. Therefore, this study evaluated the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), advanced oxidation protein products (AOPP) and glutathione reductase (GR), as well as on the modulation of inflammatory response through assessment of INF- γ and IL-10. For that eighty four adult male BALB/c mice were used, divided in two seven groups. Group A was used as negative control. The mice from groups B to G were infected intraperitoneally with 1.2×10^7 tachyzoites (RH strain). Of these, the group B represented the positive control; groups C to G represented the treatment groups, as follow: C: *T. gondii* plus ST; D: *T. gondii* supplemented by SSe; E: *T. gondii* plus DPDS; F *T. gondii* treated with ST associated with SSe; and G: *T. gondii* plus ST associated with DPDS. Samples of blood and liver were collected and analyzed on days 4 and 20 post-infection (p.i.). As results, it was possible to observe that TBARS levels significantly increased ($P < 0.05$) in groups B, C and F on day 4 p.i., while it was reduced ($P < 0.05$) in groups C, F and G on day 20 p.i. when these data were compared with group A. Levels of AOPP significantly increased ($P < 0.001$) in groups C and G on day 4 p.i., and it was reduced in groups C, F and G ($P < 0.001$) on day 20 p.i. when compared with group A. Additionally, the activity of GR significantly ($P < 0.01$) increased on day 4 p.i. in group G when it was compared with the control group. Cytokine levels showed INF- γ significantly increased ($P < 0.001$) in both periods, day 4 (groups B, C, F and G) and 20 p.i. (groups C, F and G) when compared with group A. Levels of IL-10 were significantly reduced ($P < 0.001$) on day 4 p.i. in group B, while at the same period it was increased ($P < 0.001$) in groups C and G when compared with group A. On day 20 p.i. IL-10 had its levels increased ($P < 0.001$) in groups F and G, when compared with control group. Therefore, our results highlighted that inorganic (sodium selenite) and organic (diphenyl diselenide) forms of selenium associated with the chemotherapy (a common therapeutic choice in toxoplasmosis) were able to reduce the lipid peroxidation and protein oxidation, mainly during the acute phase of the experimental infection, as well as it provided a immunologic balance between the production of pro and anti-inflammatory cytokines, avoiding over production of pro-inflammatory cytokines.

Keywords: toxoplasmosis; selenium compounds; lipid peroxidation, protein oxidation, cytokines.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Taquizoíto (A) e Bradizoíto (B) de *Toxoplasma gondii*..... 18

Figura 2 - Representação do complexo ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*..... 19

ARTIGO

Figura 1 - Levels of TBARS (1-A) and AOPP (1-B) in liver of mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*, RH strain, on day 4 and 20 p.i..... 50

Figura 2 - Levels of glutathione reductase (GR) in liver of mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*, RH strain, on day 4 and 20 p.i..... 51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Mean and standard deviation of the longevity and mortality using treatment with Bactrim[®] F, sodium selenite and diphenyl diselenide mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*..... 48
- Tabela 2 - Levels of INF- γ and IL-10 in mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii* on days 4 and 20 post infection. 49

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS.....	10
APRESENTAÇÃO	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	16
2.1.1. Morfologia	16
2.1.1.1. Taquizoítos.....	16
2.1.1.2. Bradizoíto e cisto tecidual.....	17
2.1.1.3. Oocistos.....	17
2.1.2. Ciclo biológico do parasito	18
2.1.3. Linhagens clonais	21
2.1.4. Mecanismos de defesa	22
2.1.5. Tratamento e escolha.....	23
2.2 Espécies reativas do Oxigênio ou Nitrogênio e Moléculas reativas derivadas do Óxido Nítrico.....	24
2.3 Selênio.....	26
2.3.1 Selenito de Sódio e Disseleneto de difenila.....	26
3. ARTIGO.....	28
4. CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXOS	60

APRESENTAÇÃO

Os resultados e a discussão que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo publicado no volume 141 (páginas 1761 – 1768) da revista *Parasitology* (ISSN 0031-1820), o qual se encontra no item **ARTIGO CIENTÍFICO** na última formatação submetida à revista após as revisões. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo. **AS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** se referem somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição geográfica mundial, causada por *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório, podendo apresentar, em determinadas regiões, grande impacto na saúde pública (APPLEFORD & SMITH, 2000), sendo considerada uma das enfermidades infecciosas mais difundidas dentre as transmissíveis. Do ponto de vista epidemiológico, a toxoplasmose é uma enfermidade cosmopolita sendo a sua distribuição influenciada por diversos fatores, entre os quais se podem incluir: os climáticos, os socioeconômicos, contato com animais domésticos, em especial o gato, e o consumo de carne crua ou mal cozida (CORCUERA et al, 1981). Sendo, a toxoplasmose, citada como a terceira causa mais frequentemente diagnosticada de mortes relacionadas à alimentação nos Estados Unidos (MEAD et al, 1999).

A cada ano, o *T. gondii* infecta mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo (EL-ON & PEISER, 2003), apresentando-se como uma infecção normalmente assintomática em adultos saudáveis, com o parasito persistindo por toda a vida do hospedeiro. Em recém-nascidos infectados congenitamente, e em indivíduos imunocomprometidos, a infecção se manifesta de maneira mais grave, provocando doenças oculares e psiquiátricas (DUBEY, 1996; PASSOS et. al, 2000; SORRENTINO, 2005).

Na fase inicial da infecção ocorre o processo de reconhecimento antigênico e ativação do sistema de defesa específica (LANG et al., 2006). O amadurecimento da resposta imunológica específica inibe eficientemente a replicação do *T. gondii*, porém não é capaz de destruí-lo. O parasito por sua vez apresenta mecanismos de escape do sistema imune, assumindo uma forma de baixa imunogenicidade formando cistos em tecidos, os quais se mantêm viáveis por toda a vida do hospedeiro (LANG et al., 2006). Os anticorpos persistem durante a vida do hospedeiro, mas seu papel permanece controverso, devido ao caráter intracelular do *T. gondii*. Além disso o controle da infecção pelo *T. gondii* também é mediado por células, onde a ativação dessa defesa está relacionada com tipos celulares especializados que interagem entre si através da expressão de antígenos de superfície, de mediadores específicos (citocinas) e sua interação com receptores específicos (BOHNE et al., 1993).

A profilaxia e o tratamento da infecção por *T. gondii* é muitas vezes mediada pela combinação de quimioterápicos como pirimetamina e sulfadiazina, ou em casos de intolerância à sulfas, a pirimetamina é combinado com clindamicina. Alguns estudos demonstram que o trimetoprim/sulfametoxazol é eficaz para a profilaxia primária de toxoplasmose (GROSSMAN & REMINGTON, 1979; DEROUIN & CHASTANY, 1989; CARR et al., 1992). Estes fármacos possuem baixa tolerância, apresentando efeitos colaterais graves, e também não possui efeito contra a fase crônica da infecção pelo *T. gondii*. Além disso, a resistência a alguns destes fármacos já foi observada (DANNEMANN et al., 1992; ASPINALL et al., 2002; BAATZ et al., 2006). Sabendo-se que não há vacina eficaz disponível para a prevenção da infecção por *T. gondii* em humanos (VERMEULEN, 1998), neste sentido, têm-se desenvolvido vários estudos abordando diferentes alternativas, como a utilização de suplemento com compostos de selênio. Os potenciais efeitos na promoção da saúde pelo consumo de selênio na dieta em níveis supra-nutricionais (acima de 55-70 mg por dia) têm sido amplamente documentadas (BOOSALIS, 2008; HOFFMANN & BERRY, 2008; RAYMAN, 2008). Os efeitos biológicos mais evidentes da inclusão do selênio na dieta incluem o aumento da resposta imune, melhora na resposta a infecções virais, efeito protectivo da função tireoideana, das funções cognitiva e reprodutiva, redução do risco de câncer e de doença cardíaca coronária, entre outros (FLEMING et al., 2001; LU & JIANG, 2005; RAYMAN, 2005; NAITHANI, 2008).

Com as defesas antioxidantes reduzidas devido a infecção, as espécies reativas de oxigênio (EROS) podem ser mais expressadas. EROS desempenham um papel importante nos danos nos tecidos ligados a uma ampla variedade de processos patológicos (NOHL et al., 1996). Por exemplo, a peroxidação de fosfolipídios é avaliada pelos níveis de malondialdeído (MDA) e pela avaliação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), constituindo-se no método comumente aplicado para a avaliação da peroxidação lipídica (ESTERBAUER, 1993). Outro marcador de estresse oxidativo se da pela mensuração dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), que identificam os danos oxidativo a proteínas (WITKO-SARSAT et al., 1998).

Contudo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da associação entre o sulfametoxazol/trimetoprim com disseleneto de difenila e selenito de sódio no tratamento experimental de camundongos infectados pelo *T. gondii* sobre os níveis de biomarcadores de estresse oxidativo e na modulação da resposta inflamatória.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Toxoplasma gondii*

O Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório descrito no início da década de 90 em dois importantes laboratórios: no Instituto Biológico de São Paulo, por Splendore (1908) em coelhos; no Instituto Pasteur de Tunis, por Nicolle e Manceux (1908) em roedores do norte da África, *Ctenodactylus gondii*, aos quais se deve o nome da espécie. O nome do gênero é derivado da palavra grega *toxon*, ou arco, em referência ao formato do parasito. Constituindo-se de um parasito intracelular obrigatório, taxonomicamente pertencente ao filo Apicomplexa (LEVINE, 1970), classe Coccídia (LEUCKART, 1879), Ordem Eucoccidiorida (LÉGER & DUBOSCQ, 1910), Subordem Eimeriorina (LÉGER, 1911), Família Sarcocystidae (POCHE, 1913), subfamília Toxoplasmatinae (BIOCCA, 1956), Gênero *Toxoplasma* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909), Espécie *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909).

2.1.1. Morfologia das formas

2.1.1.1. Taquizoítos

Esse estágio de multiplicação possui uma forma arqueada (Figura 1A), com aproximadamente 6µm de comprimento e 2µm de largura, encontrados durante a fase aguda da infecção, sendo também denominada forma proliferativa ou forma livre (ROBERT-GANGNEUX & DARDÉ, 2012). A fase aguda geralmente ocorre dentro de 8 a 12 dias pós-infecção, sendo os taquizoítos, capazes de atravessar barreiras teciduais como a hematoencefálica e placentária, podendo atingir o feto (WEISS & KIM, 2007). Os taquizoítos se multiplicam assexuadamente dentro da célula hospedeira por endodiogenia, uma forma especial de reprodução, pela qual, duas progênies são formadas dentro de uma célula mãe (DUBEY et al., 1998). A célula do hospedeiro se rompe quando não suporta mais o aumento do número de taquizoítos, com taxas de invasão e crescimento dependentes da cepa de *T. gondii* e tipo de célula hospedeira (DUBEY et al., 1998). Essas formas infectantes são as menos resistentes às condições ambientais adversas, ao suco

gástrico, e à desidratação ou variações osmóticas (NEVES, 1995). Segundo ARAÚJO et al. (1998), sobrevivem no meio ambiente ou na carcaça de animais por poucas horas.

2.1.1.2. Bradizoíto e cisto tecidual

O termo “bradizoíto” (do Grego *brady* = lento) foi proposto por FRENKEL (1973) para descrever o estágio de encistamento nos tecidos. Os bradizoítos (Figura 1B) diferem pouquíssimo dos taquizoítos, e são considerados como o estágio latente do parasito, consistindo a fase que marca o início da infecção crônica, na qual a multiplicação do parasito diminui de forma acentuada e a infecção pode ser mantida por um longo período (DUBEY et al., 1998). A reativação da infecção latente pode ocorrer em vários tecidos, mas o mais importante clinicamente é o sistema nervoso central (SNC), pelo risco do desenvolvimento de encefalite toxoplásmica (CARRUTHERS & SUZUKI, 2007).

Os cistos teciduais crescem conforme os bradizoítos vão se dividindo por endodiogenia (FERGUSON & HUTCHISON, 1987a; 1987b), variando de acordo com seus tamanhos; cistos jovens tendem a ser menores (cerca de 5µm), contendo um a dois bradizoítos; ao passo que cistos mais velhos podem conter centenas de bradizoítos (DUBEY et al., 1998). Os cistos teciduais, no tecido cerebral, são geralmente esferoidais e raramente atingem diâmetros de 70 µm, enquanto os cistos intramusculares são alongados e podem atingir até 100 µm (DUBEY, 1977; 1993). Os cistos intactos podem permanecer viáveis por toda a vida do hospedeiro sem causar nenhuma reação inflamatória (DUBEY et al, 1998). Ainda não se conhece bem o(s) mecanismo(s) de persistência dos cistos teciduais, porém, é possível que os cistos rompam de tempos em tempos (não se sabe precisar a frequência) e os bradizoítos se transforma em taquizoítos, reinvadindo as células dos hospedeiros e, mais uma vez, se tornando bradizoítos dentro de um novo cisto (WEISS & KIM, 2007).

2.1.1.3. Oocistos

Os oocistos são as formas resultantes do ciclo sexuado do parasito, que ocorre apenas no interior das células do epitélio intestinal dos felídeos (NEVES, 1995). Os oocistos não esporulados são de aspectos subesféricos a esféricos e medem de 10 a 12µm de diâmetro. A esporulação ocorre no ambiente, fora do intestino do felino, em média de um a cinco dias após a

excreção, estando dependente da temperatura e umidade (DUBEY et al, 1998). Os oocistos esporulados são de aspectos subesféricos a elípticos e medem 11 a 13µm de diâmetro. Cada oocisto contém dois esporocistos elípticos, medindo de 6 a 8µm de diâmetro, e cada esporocisto contém quatro esporozoítos (DUBEY et al, 1998).

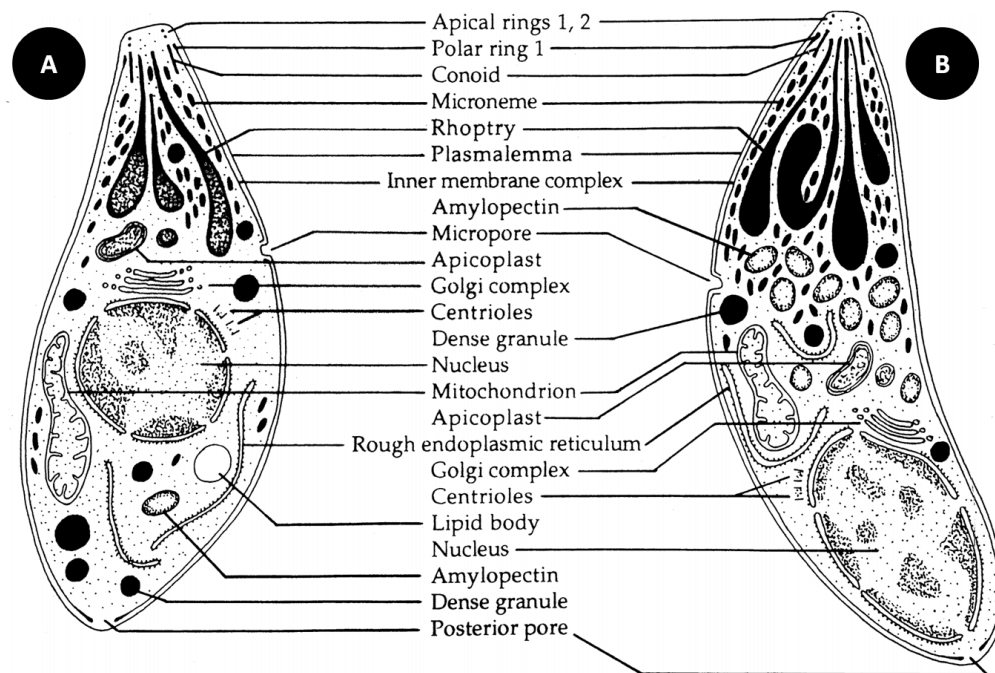


Figura 1: Taquizoíto (A) e Bradizoíto (B) de *Toxoplasma gondii*. DUBEY et al., (1998).

2.1.2. Ciclo biológico do parasito

O ciclo biológico do *T. gondii* (Figura 2) é do tipo heteroxeno, pois envolve duas fases distintas, uma sexuada, que só ocorre nos hospedeiros definitivos (HD) (FRENKEL et al., 1970), e uma assexuada, que ocorre tanto nos HD quanto nos hospedeiros intermediários (HI). Animais pertencentes à família Felidae (notadamente os gatos domésticos) são os HD, ao passo que os HI podem ser qualquer animal de sangue quente, incluindo os pássaros, herbívoros e carnívoros terrestres (roedores, animais de caça, animais de produção e o homem), além de mamíferos marinhos (baleias e golfinhos) (DUBEY, 2002).

Os felídeos podem eliminar oocistos depois de ingerir qualquer um dos três estágios infectivos do *T. gondii*, taquizoíto, bradizoíto e oocisto esporulado (WEISS & KIM, 2007). O

período pré-patente e frequência de eliminação de oocistos varia de acordo com o estágio ingerido (DUBEY & FRENKEL, 1976; FREYRE et al., 1989; DUBEY, 1996). De modo geral, o período pré-patente é de 3 a 10 dias após ingestão de cisto tecidual, ≥ 18 dias após ingestão de oocistos esporulados (DUBEY, 1996), e ≥ 13 dias após a ingestão de taquizoítos (DUBEY, 1998). Menos de 30% dos gatos eliminam oocistos após a ingestão de taquizoítos ou oocistos, ao passo que quase que uma alta porcentagem dos gatos eliminam oocistos após a ingestão de cistos teciduais (DUBEY & FRENKEL, 1976; DUBEY, 1996).

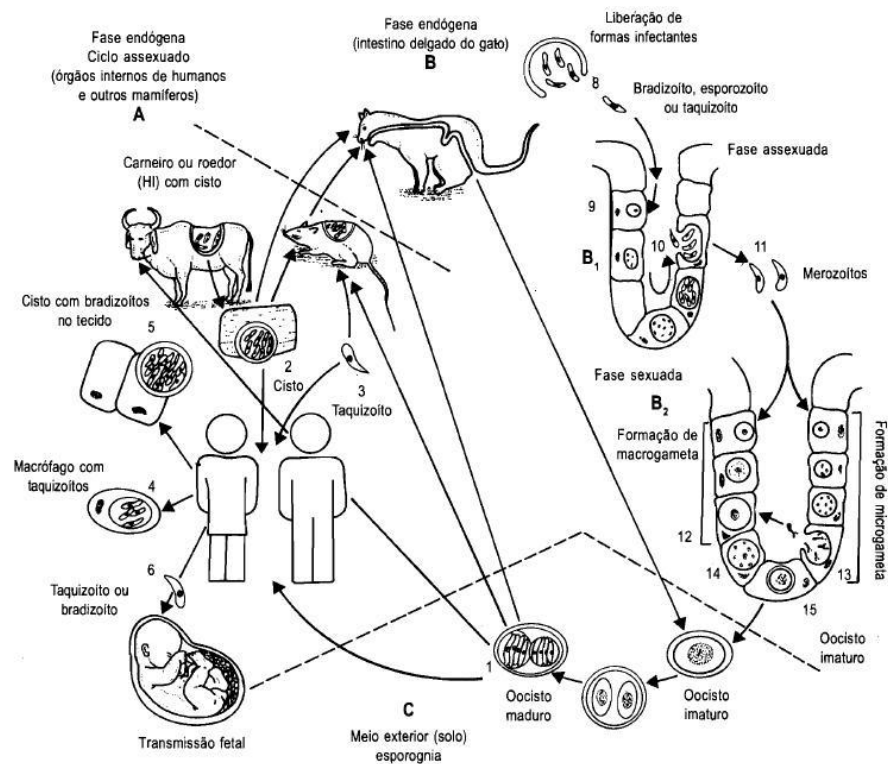


Figura 2: Representação do complexo ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*. DUBEY et al., (1998).

Após a ingestão de cistos teciduais, taquizoítos, oocistos esporulados via água e/ou alimentos, ou taquizoítos eliminados no leite é iniciado o ciclo extraintestinal, tecidual, sistêmico, merogonia, ou fase assexuada (FORTES, 1997; DUBEY et al., 1998). Esta fase pode ocorrer, além de nos felídeos, em qualquer HI. Ao atingirem a luz do tubo gastrintestinal e atravessarem a mucosa, os esporozoítos, bradizoítos, ou taquizoítos multiplicam-se rapidamente no meio intracelular por endodiogenia, como taquizoítos. Estes invadem vários tipos celulares dos organismos e formam vacúolos parasitóforos, no interior do qual se dividem também por

endodiogenia. Esse processo origina novos merozoítos, os quais promoverão a lise da célula infectada e invadirão novas células, iniciando o desenvolvimento de inúmeras gerações de merozoítos de *T. gondii* (WEISS & KIM, 2007).

Nos felídeos, além do ciclo assexuado, pode ocorrer o ciclo sexuado, gametogonia ou ciclo enteroepitelial. A origem dos gametas ainda não foi determinada, porém esses são encontrados em todo o intestino delgado, principalmente no íleo, de 3 a 15 dias após inoculação (DUBEY et al, 1998). Alguns merozoítos originam macrogametas, e outros, microgametas. O macrogameta (imóvel) permanecerá dentro de uma célula epitelial, enquanto os microgametas (móveis e flagelados) irão fecundar o macrogameta (WEISS & KIM, 2007). A fecundação ocorre na célula da parede intestinal, com a união dos dois núcleos, resultando na formação de um ovo ou zigoto que, após segregar a parede cística, dará origem ao oocisto. As células epiteliais infectadas se rompem, liberando os oocistos no lúmen intestinal, para em seguida serem eliminados junto com as fezes dos felídeos, de cinco a dez dias após o momento em que o animal foi infectado, podendo a eliminação de oocistos permanecer por 1 a 2 semanas (DUBEY, 1994; MILLER, 1997).

O homem, como HI, pode se infectar por via oral, transplacentária, através de transfusão sanguínea, transplante de órgãos, e transmissão acidental por auto-inoculação em laboratório. A infecção por via oral pode ocorrer através de: ingestão de oocistos esporulados presentes em alimentos e água contaminados, caixas de areia, ingestão de cistos contendo bradizoítos, encontrados em carne crua ou mal cozidos; ingestão de taquizoítos em leite contaminado (WEISS & KIM, 2007). A partir deste ponto, o ciclo é semelhante ao descrito para gatos, na fase assexuada. É importante ressaltar que, a disseminação do parasito ocorre através de taquizoítos livres na linfa ou no sangue circulante, podendo levar a um quadro polissintomático, cuja gravidade dependerá da quantidade de formas infectantes adquiridas, cepas do parasito e da suscetibilidade do hospedeiro (AMATO & MARCHI, 2002). Neste ponto, a evolução poderá levar a morte do hospedeiro, como muitas vezes ocorre em fetos ou em indivíduos com comprometimento imunológico, ou a intensidade pode diminuir e a doença cessar, principalmente pelo aparecimento de resposta imune específica. Com o aparecimento desta imunidade, os parasitos extracelulares desaparecem do sangue, linfa e dos órgãos viscerais, ocorrendo uma diminuição intracelular (AMATO & MARCHI, 2002).

Alguns taquizoítos, no entanto, ao invadirem as células, desenvolvem uma cápsula cística na parede do vacúolo parasitóforo, diminuindo seu metabolismo e se transformando em sua forma de metabolismo lento, os bradizoítos. Por conta da resposta imunológica formada no ato da infecção, os bradizoítos permanecem no interior destes cistos sem despertar sintomatologia significativa no hospedeiro, por meses, anos e provavelmente décadas (DUBEY & FRENKEL, 1976). A resposta imunológica limita a progressão da infecção e o desenvolvimento de novas lesões, porém não erradicam os cistos já existentes encontrados em múltiplos órgãos. Estes constituem as formas de resistência do parasito, que ocasionalmente ao se romper, liberam os bradizoítos (WEISS & KIM, 2007). Uma vez liberados, os bradizoítos podem evoluir a taquizoítos e reinfectar células vizinhas, com magnitude de infecção dependente de fatores imunológicos/inflamatórios (KAWAZOE, 2002).

2.1.3. Linhagens clonais

A classificação das linhagens clonais é baseada no polimorfismo de fragmentos do DNA gerados com enzimas de restrição - *Restriction Fragment Length Polymorphism* – (RFLP) e distinguia até poucos anos atrás três principais linhagens clonais (ou genótipos) designados como tipos (linhagens) I, II e III, e capazes de infectar tanto homem quanto os animais (WONG & REMINGTON, 1993, DARDÉ & AJZENBERG, 2003, DUBEY et al., 2003). O padrão de três linhagens foi mantido até 2011, quando KHAN e col. (2011) relataram uma quarta linhagem na América do Norte, referindo esta como “tipo 12”.

As linhagens diferem quanto a sua virulência, comportamento biológico e padrões epidemiológicos de ocorrência. Existe uma predominância de cepas do tipo II na toxoplasmose humana, e a frequência do tipo III é mais elevada em animais (HOWE & SIBLEY, 1995; GRIGG et al., 2001; DIANA et al., 2004; VILLENA et al., 2004). As linhagens de *T. gondii* tipo I são extremamente virulentas, produzindo altos níveis de parasitemia, com aumento do risco de transmissão transplacentária, aumento da morbidade e mortalidade em fetos em desenvolvimento. As linhagens dos tipos II e III levam à cronificação da infecção e produção de cistos teciduais (HOWE & SIBLEY, 1995). A quarta linhagem clonal, foi recentemente descrita por KHAN e col, (2011) em animais de vida selvagem, carecendo ainda de uma melhor classificação fisiopatológica.

A cepa padrão virulenta RH (SABIN, 1943) é classificada como do tipo I e pode ser considerada a mais patogênica. Dessa forma, essa é a cepa utilizada com mais frequência nas pesquisas e no diagnóstico, devido as suas características de rápida replicação, alta produtividade e eficiência em romper as células do hospedeiro, facilitando o isolamento de um grande número de taquizoítos. Outras cepas padrão, tais como a Me49 (tipo II) e VEG (tipo III) tem sido empregadas em estudos relacionados à infecção latente, já que são caracterizadas por uma menor patogenicidade e pela formação de cistos (ROOS et al., 1994).

2.1.4. Mecanismos de defesa

Os mecanismos de defesa do hospedeiro exercem um papel crucial no controle da atividade do *T. gondii*. Na fase inicial da infecção ocorre o processo de reconhecimento antigênico e ativação do sistema de defesa específica. O amadurecimento da resposta imunológica específica inibe eficientemente a replicação do *T. gondii*, porém não é capaz de destruí-lo. O parasito por sua vez apresenta mecanismos de escape do sistema imune, assumindo uma forma de baixa imunogenicidade formando cistos em tecidos, os quais se mantêm viáveis por toda a vida do hospedeiro (LANG et al., 2006).

O papel das células B na infecção pelo *T. gondii*, não é totalmente esclarecida. A resistência á infecção está associada a um aumento na produção de anticorpos específicos, principalmente da subclasse IgG2a em camundongos. Os anticorpos persistem durante a vida do hospedeiro, mas seu papel permanece controverso, devido ao caráter intracelular do *T. gondii*. Anticorpos contra proteínas específicas (SAG1, GRA2 e GRA6), demonstraram ser eficientes no bloqueio da invasão dos parasitas (CHA et al., 2001), sendo que o mesmo efeito não foi observado *in vivo*, através da transferência passiva de anticorpos específicos, demonstrando a pouca eficiência protetora dos anticorpos, nos modelos estudados (PAVIA, 1986).

O controle da infecção pelo *T. gondii* também é mediado por células, onde a ativação dessa defesa está relacionada com tipos celulares especializados que interagem entre si através da expressão de antígenos de superfície, de mediadores específicos (citocinas) e sua interação com receptores específicos. Na toxoplasmose, a principal citocina envolvida na resistência da infecção é o interferon- γ , o que demonstra ser uma resposta preferencialmente Th 1. Sua produção é realizada por células T CD4+ e NK, sendo principalmente regulada pela produção de IL-12. O

interferon- γ é responsável pelo aumento da capacidade fagocítica contra o *T. gondii*, aumento da expressão de MHC classe II em células T e também tem um importante papel na indução da conversão de taquizoítos para bradizoítos (BOHNE et al., 1993).

A IL-10 tem um papel importante na modulação da resposta imune contra toxoplasmose. Dados mostram que além do papel do parasita na inibição da produção da IL-12, os macrófagos sofrem a ação de citocinas moduladoras anti-inflamatórias como a IL-10, que em modelos de infecções experimentais como *Toxoplasma gondii* têm papel importante na regulação da parasitemia e da resposta inflamatória (REED, 2011).

2.1.5. Tratamento e escolha

Não há consenso sobre a melhor estratégia de controle da toxoplasmose congênita, não havendo estudos randomizados sobre tratamento de toxoplasmose em grávidas e em recém-nascidos com toxoplasmose congênita. Afirma-se que o tratamento de toxoplasmose durante a gravidez reduz em 60% a chance de infecção do feto, mas revisão sistemática não identificou nenhum estudo comparado útil para discernir se há eficácia do tratamento da toxoplasmose em grávidas (PEYRON et al., 2010). Recém-nascidos com infecção devem ser tratados, mesmo que assintomáticos, pois uma série de casos com controles históricos demonstraram redução de complicações (PEYRON & WALLON., 2001).

A trimetoprima associada ao sulfametoxazol acompanhadas de folinato de cálcio, constitui o tratamento padrão de toxoplasmose na maioria das situações em que é prescrita. Cerca de 80% dos pacientes que toleram a combinação tem decurso clínico. Em recém-nascidos este esquema é utilizado pelo período de um ano, havendo divergência quanto a doses. Sulfadiazina e pirimetamina produzem bloqueio em sequência do metabolismo do ácido fólico, e em altas doses, pirimetamina causa depleção do ácido fólico e supressão medular em que os efeitos colaterais se manifestam como anemia megaloblástica, leucopenia, trombocitopenia e pancitopenia (McEVOY, 2007).

2.2 Espécies reativas do Oxigênio ou Nitrogênio e Moléculas reativas derivadas do Óxido Nítrico

As espécies reativas estão envolvidas na patogênese de inúmeras doenças (FERREIRA et al., 1997), contudo, devido a ação espoliativa causada pelo parasito, e até mesmo as consequências oxidativas causado pelos nossos mecanismos de defesa, somando todo esse estresse oxidativo potencializa a toxoplasmose. O radical livre é uma estrutura química que possui um elétron desemparelhado, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho (SALVADOR & HENRIQUES, 2004; WEBB & TWEDT, 2008). Isso torna a molécula muito instável, reativa e com uma enorme capacidade para combinar-se inespecificamente com as diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivados de cada uma delas. Os radicais livres são, em geral, formados por reações redox ou por processos de catalise enzimática (SALVADOR & HENRIQUES, 2004).

A espécie reativa do oxigênio (ERO) é um termo coletivo usado para moléculas ou átomos formados pela redução do oxigênio e abrangem radicais livres e não radicais, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO) e peroxinitrito (ONOO) (SALVADOR & HENRIQUES, 2004; HALLIWELL & CUTTERIDGE, 2008; WEBB & TWEDT, 2008). Nas espécies reativas do nitrogênio (ENOS), o óxido nítrico é uma molécula/radical livre paramagnética, pois possui elétrons não pareados na sua camada de valência. No momento em que esse elétron é removido por oxidação, forma-se o cátion nitrosônio (NO^+) e, quando há redução de um elétron, o ânion nitroxila (NO^-) é produzido. O ânion NO^- é muito reativo, podendo gerar óxido nitroso (N_2O) e possivelmente, radical hidroxila. (SALVADOR & HENRIQUES, 2004).

Em situações fisiológicas, a formação de espécies reativas ocorre normalmente no organismo, especialmente durante a respiração. Na mitocôndria, em torno de 1 a 2% do O_2 participa de reações monoelétrônicas, escapando da redução tetravalente do O_2 pela aceitação de quatro elétrons para sua neutralização, resultando na formação de H_2O . O aumento da formação dessas EROs pode levar à condição de estresse oxidativo (SIES, 1997; SHAW, 1998; HALLIWELL & CUTTERIDGE, 2008). Assim, as espécies reativas, em condições fisiológicas, formam-se em proporções controladas pelos mecanismos defensivos celulares. Entretanto, em situações patológicas, essa produção pode aumentar substancialmente. Dessa forma, o estresse

oxidativo pode resultar de uma situação em que há uma diminuição nos níveis das enzimas antioxidantes e/ou por uma elevada velocidade na produção de EROs (SALVADOR & HENRIQUES, 2004).

Desta forma a peroxidação lipídica é definida como a deterioração oxidativa de lipídeos poli-insaturados. Esse fenômeno acontece quando radicais hidroxilas interagem com as cadeias de ácidos graxos poli-insaturados resultando em uma alta variedade de aldeídos eletrofílicos reativos (HALLIWELL & CUTTERIDGE, 2008; REED, 2011). Assim, as membranas celulares, que são compostas de fosfolipídeos são as mais atingidas (HALLIWELL & CUTTERIDGE, 2008). O encéfalo é particularmente susceptível ao estresse oxidativo uma vez que consome grandes quantidades de oxigênio e as membranas neuronais contêm altos níveis de lipídeos poli-insaturados. Assim, a realização de técnicas para mensurar os produtos da peroxidação lipídica são de grande importância, sendo que cada técnica mede um produto resultante diferente. O teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é o método mais utilizado para medir a peroxidação de ácidos graxos, de membranas e de alimentos (SALVADOR & HENRIQUES, 2004). Neste mesmo sentido, os produtos de oxidação proteica (AOPP) têm sido considerados novos marcadores de oxidação e dano às proteínas, podendo ser utilizados para estimar o dano oxidativo proteico (KELLY et al., 2002, WITKO-SARSAT et al., 1996). Vários estudos têm relacionado AOPP com diferentes doenças, como: Diabetes mellitus (KALOUSOVÁ et al., 2002), doença de Alzheimer (MARKESBERRY, 1997) e em neonatos prematuros (BUONOCORE et al., 2002), constituindo-se de um marcador fidedigno para estimar o grau de dano proteico mediado por oxidação.

Considerando-se a peroxidação lipídica como danosa ao organismo cabe lembrar que as células são normalmente protegidas do dano oxidativo por um sistema de defesa antioxidante, que abrange proteínas, enzimas e compostos químicos (CIMEN et al., 2000). A defesa antioxidante enzimática é representada principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR) enquanto as defesas antioxidantes não enzimáticas incluem as vitaminas C, E e compostos orgânicos contendo grupos sulfidrílica (SH), denominados tióis. A glutatona, um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (MEISTER & ANDERSON, 1983). A glutatona

redutase (GR) não age diretamente na remoção de espécies radicalares, porém é responsável pela regeneração da glutatona à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutatona (MEISTER & ANDERSON, 1983). Em particular, problemas na síntese e metabolismo da glutatona estão associados a algumas doenças, nas quais os níveis de glutatona e das enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser bastante significativos para o diagnóstico de alguns tipos de câncer, bem como em outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (DENEKE & FANBURG, 1989; OBERLEY E OBERLEY, 1997; NAVARRO et al., 1999).

2.3 Selênio

Para limitar os efeitos maléficos das espécies reativas, é necessária a presença de um sistema antioxidante de alto desempenho que possibilite regular a produção destas espécies reativas, diminuindo a limites fisiológicos. O Selênio (Se) é um componente fundamental na vida das células de uma variedade de organismos (NOGUEIRA & ROCHA, 2010), sendo reconhecido como um nutriente essencial em 1957. Em 1973, foi descoberto que o Se é um componente fundamental para o funcionamento da enzima glutatona peroxidase (GSH-Px) (ZICKER et al., 2006). O papel principal para GSH-Px é a defesa contra as espécies reativas, catalisando a redução do peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos orgânicos, que reagem com o grupo selenol, do centro ativo da selenocisteína (ZICKER et al., 2006).

O conceito de que moléculas contendo selênio possam ser melhores antioxidantes do que os clássicos antioxidantes levaram ao desenvolvimento de compostos sintéticos organo-selênio (ARTEEL e SIES, 2001). De fato, o interesse na bioquímica, farmacologia e toxicologia dos organo-selênios aumentou na década de 80, pois estudos demonstraram que o ebselen foi um promissor antioxidante e mimético da selenoenzima GSH-Px (NOGUEIRA & ROCHA, 2010).

2.3.1 Selenito de Sódio e Disseleneto de difenila

As principais fontes de selênio inorgânico são selenato de sódio (Na_2SeO_4) e o selenito de sódio (Na_2SeO_3), porém não são naturalmente encontradas nos tecidos. Desta maneira a

assimilação, distribuição e acumulação de selênio nos tecidos dependem de uma fonte de selênio (SURAI et al., 2006). O selenito pode oxidar tióis como a cisteína, glutathiona reduzida, coenzima A, Ácido lipóico e cisteína proteica (GANTHER, 1971). Essa reação apresenta importância fisiológica e provavelmente constitui o primeiro passo para a incorporação do selênio inorgânico nos sistemas biológicos (GANTHER, 1971). Entre outras características, o Selenito de Sódio é mais eficiente do que a selenometionina em reestabelecer as atividades da GSH-Px em animais com deficiência de Se (GARIELSEN & OPSTVEDT, 1980).

O disseleneto de difenila é um simples e estável organo-selênio. Esse composto é um reagente eletrofílico usado na síntese de uma variedade de outros organo-selênios farmacologicamente ativos. As atividades biológicas do disseleneto de difenila têm sido estudadas e este composto mostrou-se uma opção terapêutica viável. Uma das características dos disselenídeos sintéticos é a formação de grupos selenol através da clivagem e redução das ligações do disseleneto, sendo esses grupos bons imitadores da GSHPx. Além disso, mesmo com características bioquímicas semelhantes ao ebselen, o disseleneto de difenila apresenta-se mais ativo na mimetização da GSHPx e menos tóxico em ratos do que o ebselen (ROSA et al., 2007). Também, o disseleneto de difenila apresentou melhor potencial antioxidante do que outros disselenídeos testados na redução da peroxidação lipídica de cérebro de ratos (ROSSATO et al., 2002).

Sabendo-se da importância da toxoplasmose na saúde pública e da crescente inclusão de alternativas terapêuticas em associação aos já estabelecidos protocolos terapêuticos a doença, o objetivo do trabalho foi avaliar a ação do selenito de sódio e do disseleneto de difenila no protocolo padrão na toxoplasmose “modelo experimental” com a determinação de citocinas e do estresse oxidativo. Os resultados, discussões e conclusões obtidos estão apresentados na forma de um artigo que compõem o item 3 dessa dissertação.

3. ARTIGO

Diphenyl diselenide and sodium selenite associated with chemotherapy in experimental toxoplasmosis: influence on oxidant/antioxidant biomarkers and cytokine modulation

Cleber F. Barbosa^a, Alexandre A. Tonin^b, Aleksandro S. Da Silva^c, Maria I. de Azevedo^a, Danieli U. Monteiro^a, Emily P. Waczuk^d, Thiago Duarte^e, Carine Hermes^f, Giovana Camillo^g, Fernanda F. Vogel^g, Luciana Faccio^a, Patricia Wolkmer^d, Marta R. Leal^g, Marta M. M. F. Duarte^h, Rafael N. Moresco^f, Sonia T. A. Lopes^b, Mario L. de La Rue^a

^a Department of Microbiology and Parasitology. Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

^b Department of Small Animal Clinical. Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

^c Department of Animal Science. Universidade do Estado de Santa Catarina, Brazil.

^d Department of Chemistry. Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

^e Department of Physiology and Pharmacology. Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

^f Department of Clinical and Toxicological Analysis. Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

^g Department of Preventive Veterinary Medicine. Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

^h Universidade Luterana do Brasil, ULBRA. Brazil.

The study was carried out at: Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Avenida Roraima 1000, Prédio 20, Sala 4232, 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

(Artigo publicado no periódico Parasitology – Volume 141, Páginas 1761 a 1768 - Anexo I)

Abstract

The aim of this study was to assess the effect of sulfamethoxazole/trimethoprim (ST) associated with diphenyl diselenide (DPDS) and sodium selenite (SSe) in experimental toxoplasmosis, on oxidant/antioxidant biomarkers and cytokine levels. Eighty four BALB/c mice were divided in 7 groups (Gr): group A (negative control), and groups B to G (infected). Blood and liver samples were collected on days 4 and 20 post-infection (p.i.). TBARS and AOPP were significantly increased in infected groups on day 4 p.i., while they were reduced on day 20 p.i., comparing with GrA. GR activity significantly ($P<0.01$) increased on day 4 p.i., in GrG, comparing with GrA. INF- γ was significantly increased ($P<0.001$) in both periods, day 4 (GrB, GrC, GrF Gr) and 20 p.i. (GrC, GrF and GrG). IL-10 significantly reduced ($P<0.001$) on day 4 p.i. in GrB, however, at the same period, it was increased ($P<0.001$) in GrC and GrG, comparing with GrA. On day 20 p.i., IL-10 increased ($P<0.001$) in GrF and GrG. Therefore, our results highlighted that these forms of Se, associated with the chemotherapy, were able to reduce the lipid peroxidation and protein oxidation, providing an immunologic balance between the production of pro and anti-inflammatory cytokines.

Keywords: toxoplasmosis; selenium compounds; lipid peroxidation, protein oxidation, interleukins.

1. Introduction

The protozoan parasite *Toxoplasma gondii* is the etiologic agent of toxoplasmosis, a worldwide infection affecting 500 million to 1 billion people (Tenter *et al.*, 2000). Toxoplasmosis is usually asymptomatic in immunocompetent adults, but can cause mortality in the very young and the immunocompromised (Dubey, 2010). Members of Felidae family are considered the definitive hosts for toxoplasmosis, but intermediate hosts are the most affected by toxoplasmosis. In immunocompromised individuals, *Toxoplasma* is an important opportunistic pathogen due to fulminate re-emergence of chronic infections (Luft *et al.*, 1984). Acute infections acquired during pregnancy are also capable of causing severe birth defects, including hydrocephaly, calcification, neurological defects, and chorioretinitis, which may be recurrent (Wong & Remington, 1994). Recent studies have shown that an infection with *T. gondii* may affect behaviors of hosts

(Gatkowska *et al.*, 2012) and may be a causative or contributory factor for certain psychiatric disorders, sterility, and cancers (Li *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2007).

Prophylaxis and treatment of *T. gondii* infection is often by combination chemotherapy with pyrimethamine and sulfadiazine, or in cases of sulfa intolerance, pyrimethamine is combined with clindamycin. Several studies have shown that trimethoprim/sulfamethoxazole is effective as primary prophylaxis of toxoplasmosis (Grossman & Remington, 1979; Derouin & Chastany, 1989; Carr *et al.*, 1992). However, generally these drugs are poorly tolerated, presenting severe side effects, and cannot act against chronic *T. gondii* infections. In addition, resistance to some of these drugs has recently been noted (Dannemann *et al.*, 1992; Aspinall *et al.*, 2002; Baatz *et al.*, 2006). Added the fact that there is no effective vaccine available for the prevention of *T. gondii* infection in humans (Vermeulen, 1998) the development of effective drugs with low toxicity, associative therapies, or treatments of support, which may enhance the effectiveness or reduce the adverse effects of traditional chemotherapy, are necessary to treat the diseases caused by *T. gondii*.

In this sense some studies have been developed, such as the utilization of supplementation with selenium compounds. The potential health-promoting activities of dietary selenium consumption at supranutritional levels (above 55–70 µg per day) have been widely documented (Boosalis, 2008; Hoffmann & Berry, 2008; Rayman, 2008). The most evident biological effects of selenium include enhanced immune response and antiviral effects, protection of thyroid, cognitive and reproductive functions, reduced risk of cancer and coronary heart disease (Fleming *et al.*, 2001; Lu & Jiang, 2005; Rayman, 2005; Naithani, 2008). Chemically, selenium is a component of the amino acid selenocysteine (Sec; U), which is a cysteine analogue with a selenium atom replacing a sulfur atom. Proteins containing Sec are called selenoproteins. Physiologically, twenty-five selenoprotein genes are present in the human genome (Kryukov *et al.*, 2003), but only a few of these proteins have been functionally characterized, e.g., glutathione peroxidases (GPx), thioredoxin reductases (TrxR), and iodothyronine deiodinases (DIO), which all have oxidoreductase functions (Papp *et al.*, 2007). GPx and TrxR participate in the reduction of hydrogen peroxide and lipoperoxide (Arthur, 2000; Papp *et al.*, 2007); thus, the physiological role of GPx and TrxR is regulation of oxidative stress. Since the active site of GPx and TrxR contains the Sec residue, selenium is essential for the activity of these enzymes (Arthur, 2000).

When the oxidoreductase functions are diminished reactive oxygen species (ROS) can be over expressed. ROS have been implicated to play an important role in tissue damage in a variety of pathological processes (Nohl et al., 1996). Over production of ROS in diverse pathological conditions cause oxidative damage resulting in enhanced lipid peroxidation and DNA strand breaks (Halliwell, 1994; Chaudhuri *et al.*, 2008). The phospholipid peroxidation is evaluated by the levels of malondialdehyde (MDA) and the assessment of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) is the most commonly applied method for the measurement of lipid peroxidation (Esterbauer, 1993). Another marker of oxidative stress is advanced oxidation protein products (AOPP), which identifies oxidative damage to proteins (Witko-Sarsat *et al.*, 1998). In toxoplasmosis, tachyzoites are highly virulent and cause a generalized disease which is always fatal (Frenkel, 1988). Cytokines such as IFN- γ and TNF- α are important for controlling tachyzoites replication during both acute and chronic phases of infection (Suzuki *et al.*, 1989; Gazzinelli *et al.*, 1992; Johnson, 1992; Gazzinelli *et al.*, 1993; Scharon-Kersten *et al.*, 1996). In contrast, interleukin-10 (IL-10) appears to be crucial at the initial phase of infection and less important during chronic toxoplasmosis (Gazzinelli *et al.*, 1994; Gazzinelli *et al.*, 1996). Experimental evidence has indicated that circulating cytokines are capable of eliciting the overproduction of ROS (Liu *et al.*, 2001), as well as tissue damage through the over induction of inflammatory cytokines (Mordue *et al.*, 2001).

Therefore, the aim of this study was to assess the effect of sulfamethoxazole/trimethoprim associated with diphenyl diselenide and sodium selenite in treatment infected mice by *T. gondii* on the levels of TBARS and AOPP, as well as on the modulation of inflammatory response through assessment of INF- γ and IL-10.

2. Material and methods

2.1. Experimental Animals

Eighty four adult male BALB/c mice (*Mus musculus*), average 60 days old and with weight varying from 22 to 24 g were purchased from Centre for Experimental Animals of Universidade Federal de Santa Maria/UFSM. They were kept in an experimental room with controlled temperature and humidity (25°C; 70% RH), fed a commercial ration, with water *ad libitum*, and submitted to a period of 7 days of adaptation. The procedure was approved by the Animal Welfare Committee of UFSM, number 73/2012

2.2. *Toxoplasma gondii* strain and inoculum preparation

For this experiment, it was utilized a strain of *T. gondii* (RH, isolated by Sabin 1941), kept in liquid nitrogen in laboratory. Firstly, one mouse was inoculated intraperitoneally with tachyzoites of *T. gondii*. Four days later, peritoneal fluid containing the parasite was collected and inoculated into other mice. This procedure was repeated three times, in order to reactivate the parasite virulence; the last inoculation was carried out in 5 mice aiming to obtain a large number of *T. gondii* tachyzoites for the mice infection.

2.3. Reagents

Diphenyl diselenide (Ph_2Se_2) (99.9%) and sodium selenite ($\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$) (99%) were purchased from SIGMA (St. Louis, MO, USA). Sulfamethoxazole/trimethoprim (ST) (Bactrim[®] F suspension), available as a commercial product, was purchased from ROCHE - *Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.* (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Sodium selenite diluted in physiologic solution (0.9%) resulting in a final concentration of 1.67%. Diphenyl diselenide was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, USA) at final concentration of 0.1%. During the course of this study DPDS and SSe will be the acronym for diphenyl diselenide and sodium selenite, respectively.

2.4. Experimental design

The eighty four animals were divided in seven groups (A, B, C, D, E, F, G with 12 animals/each group). These groups were divided again in two subgroups (A1 and A2, B1 and B2, C1 and C2, D1 and D2, E1 and E2, F1 and F2, G1 and G2 – with 6 animals/each group). All infected mice received, intraperitoneally, a volume of 0.5 mL of peritoneal fluid, containing 1.2×10^7 tachyzoites. 0.5 mL saline was administered in group A, by the same via. Treatment with ST was performed twice a day (0.5 mg kg^{-1}), orally; from day 1 to 20 p.i. Sodium selenite (intramuscularly) and diphenyl diselenide (subcutaneous) were administered on the first day p.i, at 1 mg kg^{-1} and $5 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$, respectively.

The treatments were carried as follows: Groups A and B served as negative (uninfected) and positive (infected) controls, respectively; in groups C, the animals were infected with *T. gondii* and treated with ST; group D was composed by mice infected with *T. gondii* and

supplemented with SSe; in group E the mice were infected with *T. gondii* and received DPDS; group F was composed by animals infected with *T. gondii* and treated with combination ST F plus and SSe; and finally, the mice of group G were infected with *T. gondii* and treated with the combination of ST and DPDS.

On day 4 post infection (p.i.) (subgroup A1, B1, C1, F1 and G1) and day 20 p.i. (subgroup A2, C2, F2 and G2) the sample collections were performed. Animals of groups B2, D1, D2, E1 and E2 did not survive until the days 4 post-infection. In both periods, the surviving animals were anesthetized in chamber with isoflurane and submitted to cervical dislocation, for posterior collection of blood by cardiac puncture (1.0mL) and liver tissue. Fragments of livers were homogenized in 10 mmol Tris-HCl buffer pH 7.2, and then centrifuged at 5000 g for 10 min. The supernatant was collected for analysis of TBARS AOPP and GR. Samples were stored in tubes and frozen at -80°C until analyzed. All the procedures described above were performed with refrigerated temperature (4°C).

2.5. TBARS and AOPP

All the evaluations were performed in liver tissue, since Mordue *et al.*, (2001) reported that liver was the major site of tissue pathology during lethal toxoplasmosis. Thus, lipid peroxidation (TBARS levels) was measured as described by Ohkawa *et al.*, (1978); Protein oxidation was assessed through measurement of AOPP concentrations by a method previously described by Witko-Sarsat *et al.*, (1998). Results of AOPP levels were expressed in $\mu\text{mol/L}^{-1}$ protein, while TBARS concentration was expressed in nmol MDA/g tissue

2.6. Glutathione reductase (GR)

GR activity in liver homogenized was assessed by the automated technique using Cobas Mira[®] analyzer (Hermes *et al.*, 2013), with results expressed as U/g protein.

2.7. Cytokines

Interleukins quantification was assessed by ELISA using commercial kits from mouse INF- γ and IL-10 (eBioscience[®], San Diego, USA), according to manufacturer's instructions. Briefly, microplates were sensitized with the primary antibody at room temperature (RT) for 30 min. Then, the serum sample was added and incubated (37°C , for 30 min). After washing, the

secondary antibody conjugated with peroxidase was added and incubated. The presence and concentration of the interleukins were determined by the intensity of the color measured by spectrometry in a micro ELISA reader.

2.8. Statistical analysis

The data were submitted to analysis of variance followed by the student *t* test ($P<0.05$), performed using SAS statistical package (SAS Institute, Cary, NC, USA) with a significance level of 5% ($P<0.05$).

3. Results

3.1. Course of infection after treatment

Results the longevity and mortality using treatment with Bactrim[®] F, sodium selenite and diphenyl diselenide in mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii* were presented in Table 1. Mice treated only with selenium compounds (group D and E) were not able to control the disease, dying within 5 days after infection as happened with the positive control (group B). The treatment only with the chemotherapy (group C) or in combination with selenium compounds (group F and G) controlled the disease, preventing mortality in most of the animals tested, and thus prolonging the longevity.

3.2. TBARS and AOPP

Biomarkers of lipid peroxidation and protein oxidation in liver tissue were clearly altered in mice experimentally infected with *T. gondii*. Figure 1-A shown that TBARS levels significantly increased ($P<0.05$) in groups B, C, D, E and F on day 4 p.i., while it was reduced ($P<0.05$) in groups C, F and G on day 20 p.i., when these data were compared with the control group. Levels of AOPP (Figure 1-B) significantly increased ($P<0.001$) in groups C and G on day 4 p.i., and it was reduced in groups C, F and G ($P<0.001$) on day 20 p.i. when compared with group A.

3.3. Glutathione reductase (GR)

GR activity was significantly ($P<0.01$) increased on day 4 p.i. in group G when it was compared with the control group, while on day 20 p.i. no statistical differences were observed. Data are shown on Figure 2.

3.4. Cytokines

Levels of interleukins are shown in Table 2. It was possible to observe statistical differences in both periods. Levels of INF- γ were significantly increased ($P<0.001$) in both periods, day 4 (groups B, C, D, E, F and G) and 20 (groups C, F and G) p.i. when compared with the untreated/control group. Levels of IL-10 were significantly reduced ($P<0.001$) on day 4 p.i. in groups B, D and E while at the same period it was increased ($P<0.001$) in groups C and G when compared with group A. On day 20 p.i. the IL-10 had its levels increased ($P<0.001$) in groups F and G, when compared with untreated/control group.

4. Discussion

Toxoplasmosis may cause severe disorders in immunocompromised patients and in pregnant women, because of high risk of transplacental transmission and the occurrence of multiple congenital lesions in the fetus (Foulon *et al.*, 1999). During infection, the immune effectors cells are able to kill or inhibit its intracellular growth (Denkers & Gazzinelli, 1998). This anti-protozoan activity produces a number of toxic products such reactive oxygen intermediates, while, within the host cell, *T. gondii* itself produces oxidants as by products of normal metabolism. ROS are potentially destructive, capable of oxidizing proteins or lipids and causing chemical modifications to nucleic acids (Halliwell & Gutteridge, 1999). Our experimental design led the mice to develop an acute toxoplasmosis, and due to the high virulence of RH strain of *T. gondii* used, it was observed some interesting patterns in the biomarkers of oxidative stress evaluated, as well as in the inflammatory modulation.

In this sense, and beginning our discussion with the biomarkers of oxidative stress, it was possible to observe that TBARS levels significantly increased on day 4 p.i. in groups B, C, D, E and F when compared to negative control (A) and group G. This situation was already expected for groups B and C, since due to the parasitic infection, these groups did not received antioxidant therapy; Additionally, mice of group C received the chemotherapeutic drug. Thus, we expected a reduction in TBARS levels in both groups where chemotherapy was associated with SSe and

DPDS. Interestingly, TBARS levels were only statistically reduced only in group G, where the association of ST with DPDS was used. The biological importance of selenium and its inorganic forms is well documented, mainly because its strong antioxidant activity, including ebselen analogues, benzoselenazolinones, selenamide and related derivatives, diaryl diselenides, various tellurides and ditellurides, and the semi-synthetic enzyme selenosubtilisin (Mugesh *et al.*, 2001; Rossato *et al.*, 2002; Brenneisen *et al.*, 2005). The promising compound ebselen is an example of such a molecule; it has antioxidant properties and is known as the most important glutathione peroxidase mimetic agent. Unlike inorganic selenium and selenomethionine, it is not toxic to mammals since it contains bound selenium and thus does not contribute to the cellular selenium pool (Sies, 1993; Schewe, 1995; Ganther, 2001). In this context and of particular importance, DPDS has been shown to be even more active as a glutathione peroxidase (GPx) mimetic, and less toxic to rodents than ebselen (Meotti *et al.*, 2003; Nogueira *et al.*, 2003). Therefore, the maintenance of TBARS levels in group G (day 4 p.i.), at almost the same level of the negative control group, was strongly linked to the increased activity of GR observed only at the same group G, since it is well known that the regulation of the cytosolic redox milieu is essential for cell survival.

By the other hand, assessment of TBARS levels on day 20 p.i. were quite interesting, since they were reduced in groups C, F and G, when compared with the negative control group (A). It was expected, before the development of the experiment, groups G and F with, at least, TBARS levels similar of group A due to the presence of antioxidants DPDS and SSe in their treatments. Concomitantly, we expected group C, under ST therapy, with increased TBARS levels. This results might be explained by an enzymatic pathway, the cytochrome P450 (CYPs) enzyme system. CYPs enzyme system is responsible for the oxidative metabolism of hundreds of drugs, belonging to a family of heme proteins that catalyze the metabolism of a vast array of endogenous and exogenous substrates (Cooper *et al.*, 1965; Nebert & Dalto, 2006; Guengerich, 2008). Among the various cytochrome P450 enzymes, the 2C8 and 2C9 isoforms are of particular relevance in patients receiving trimethoprim–sulfamethoxazole therapies, because the 2C8 isoform is inhibited by trimethoprim and the 2C9 isoform is inhibited by sulfamethoxazole (Wen *et al.*, 2002). Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), for example, it is mainly located in the endoplasmic reticulum and which plays a critical role in the metabolism and activation of xenobiotics and in the presence or even the absence of substrates. CYP2E1, with O₂ and

NADPH, can produce ROS, which leads to oxidative stress and apoptosis (Cederbaum *et al.*, 2001). CYP2E1 is among the most active CYPs in producing ROS; therefore, its overexpression is associated with several cellular markers of oxidative stress, as well as with decreased viability, as a result of both, necrosis and apoptosis (Wu & Cederbaum, 2001; Thum & Borlak, 2002; Schattenberg *et al.*, 2004; Butura *et al.*, 2009). However, Dan Lu *et al.*, (2012) reported that mice knockdown for CYP2E1 significantly ameliorated oxidative stress, by decreasing H₂O₂ and MDA, added to an increased level of GSH. Therefore, our TBARS results on day 20 p.i. probably were outcomes of an inhibition of CYPs by prolonged use of ST. This finding is also supported by the levels of GR on day 20, which were kept statistically equal in all the groups, when compared with group A, instead of diminished, as happened with TBARS levels of infected groups at the same time.

Glutathione reductase (GR [EC 1.8.1.7] catalyzing the reaction $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$) is a key enzyme in this system, because it maintains millimolar concentrations of reduced glutathione (GSH), rendering GSH the most abundant reductant in human cells (Kamerbeek *et al.*, 2007). By the other hand, the same results, at the same time of sampling, were not reached for association of ST with SSe. Our hypothesis for this result is based on the knowledge of the toxicity of SSe, since at elevated concentrations, selenium is also extremely toxic and there is mounting evidence that it's toxicity in both prokaryotes and eukaryotes relates to its prooxidant capacity (Spallholz, 1994). For example, in the reduction of selenite by reduced glutathione and other thiols, superoxide (and, in some cases, hydrogen peroxide) can be generated (Seko *et al.*, 1989; Ip *et al.*, 1991; Spallholz, 1994) Thus, toxicity is thought to become manifested when the prooxidant conditions exceed cellular antioxidant defenses (Spallholz, 1994) and this might explain a possible mechanism of toxicity and elevated levels of TBARS, even when SSe was associated with ST. The dose of 1mg kg⁻¹ of SSe was based on previous experiments with the protozoan *Trypanosoma evansi* (Tonin *et al.*, 2011), however, intramuscularly instead of subcutaneous, might leading to toxic effects. Supporting out theory is the fact that, even without statistical difference, mice treated only with SSe died in average one day before mice treated only with DPDS.

Quite similar results of TBARS were obtained in both period for AOPP levels (Figure 1-B), differing on day 4 p.i., where levels of AOPP were statistically increased in groups C and G when compared to group A and F. The exquisite vulnerability of proteins to ROS is now well

documented (Davie, 1987; Davies & Goldberg, 1987; Heinecke *et al.*, 1993; Dean *et al.*, 1997), therefore this increase in groups C and G probably was a result of the interaction between the parasitic load with ROS production. The interesting finding in the assessment of this parameter was the inversion in the protective action of antioxidants, since for AOPP the protective effect was provided by the association of ST with SSe (group F) instead of by ST with DPDS (group G), how it was for TBARS. A possible explanation of this situation lies on two aspects, first the oxidation pathway and second the classification and distribution of selenium compounds. Regarding to the first aspect, it is important to remember that reactive carbonyl compounds (RCCs) formed endogenously during lipid peroxidation and the glycoxidation of carbohydrates are precursors of advanced glycation end products (AGEs) and advanced lipid peroxidation end products (ALEs), which form cross-links on tissular proteins (carbonyl stress), and accumulate during ageing and in chronic diseases (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Smit & Lutgers, 2004). Carbonyl stress induces progressively protein dysfunctions and damages in all tissues, leading to increased levels of AOPP, with pathological consequences such as inflammation and apoptosis contributing to the progression of diseases (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Petersen & Door, 2004). In this sense, it is possible to place AOPP as an immediate and direct consequence of lipid peroxidation and glycoxidation of carbohydrates. In relation to selenium compounds distribution, stands out the highly lipophilic property of diphenyl diselenide. Prigol *et al.*, (2009) demonstrated that DPDS exhibits a concentration time profile characterized by an early peak concentration and rapid distribution from blood to the central nervous system, where it exerts its pharmacological and toxicological effects. By the other hand, Davidson-York *et al.*, (1999) found the pigs receiving repeated oral toxic doses of sodium selenite had a biological half-life of selenium of 12 days. Additionally, the organic forms of Se, such as DPDS, have higher bioavailability and antioxidant properties than inorganic forms (Mahan *et al.*, 1999; Mahmoud & Edens, 2003), represented in our case by SSe. Therefore, might the protective effect on AOPP formation caused by the association of ST plus SSe, was due to the own characteristics of SSe (less bioavailability), in comparison with the highly lipophilic property and absorption of DPDS, when both antioxidant actions/properties are compared with the progressive formation of oxidative processes. Thus, whether the DPDS is highly lipophilic with fast absorption we expected a satisfactory action on preventing generation of lipid peroxidation, while an antioxidant with less bioavailability (in our study SSe), but with longer half-life may prevents a late protein

peroxidation. AOPP findings on day 20 p.i. were in accordance with TBARS assessment, being both reduced in all groups when compared with group A. Knowing that both biomarkers are mainly generated by oxidative stress process, the same mechanism may be responsible for this reduction of AOPP.

Based on the discussion of the changes observed in these two biomarkers of injury cell (IC), it was possible to assume that an inflammatory response was generated, especially during the first time of analyze. *T. gondii* is capable of infecting sites of immune privilege, including the retina, CNS, and placenta. In these tissues, cellular immunity is important for control of infection; however, the extent of tissue inflammation is often disproportionate to the presence of parasites, suggesting that the resulting pathology is partially immune-mediated (Frenkel & Escajadillo, 1987; Frenkel, 1988; Brezin *et al.*, 1994; Roberts & McLeod, 1999; Holland, 2000). Aiming to assess this response, as well as check it for agreement with cell lesion, we evaluated the levels of INF- γ and IL-10.

Studies have been showing the importance of T cells in resistance against *T. gondii* are nonequivocal (Denkers & Gazzinelli, 1998). If not controlled by the immune system, tachyzoites are highly virulent and cause a generalized toxoplasmosis which is always fatal. Cytokines such as IFN- γ and TNF- α are important for controlling tachyzoite replication during both acute and chronic phases of infection (Suzuki *et al.*, 1989; Gazzinelli *et al.*, 1991; Gazzinelli *et al.*, 1992, Johnson, 1992; Scharon-Kersten *et al.*, 1996). In contrast, interleukin-10 (IL-10) appears to be crucial at the initial phase of infection and less important during chronic toxoplasmosis (Gazzinelli *et al.*, 1994; Gazzinelli *et al.*, 1996). Our results highlighted some important alterations in the levels of the interleukins assessed in animals under ST single treatment or ST associated with DPDS/SSe, as well as their possible interactions with the response against the experimental infection. A hallmark of *T. gondii* infection is the induction of a strong Th1-mediated immunity, especially with production of IFN- γ (Denkers & Gazzinelli, 1998).

In our study IFN- γ was statistically increased in both moments in all the groups when compared to group A (uninfected) and statistically reduced on day 4 p.i. when they are compared to group B, D and E, demonstrating an expected response against the parasite. However, the most interesting finding on IFN- γ is when its responsiveness is compared among groups C, F and G, or the infected groups. Mordue *et al.*, (2001), when comparing the response of immunocompetent outbred mice to infection by type I and type II strains of *T. gondii*, found that infections with the

type I RH strain were characterized by their rapid ability to reach tissue burdens associated with lethality, lethal infections were associated with overinduction of inflammatory cytokines rather than an insufficient immune response. Yet, lethality was associated with excessive levels of Th1 cytokines, particularly IL-18 and IFN- γ , in the serum, concluding that their findings indicate that acute virulence in *T. gondii* is associated with overstimulation of Th1 cytokines, which paradoxically are also required for protection. In our study the levels of IFN- γ were statistically reduced in groups F and G when compared to group C on day 4 p.i., demonstrating the influence of SSe and DPDS associated with ST. These findings strongly support the protective action of both antioxidants in the acute infection with *T. gondii*, probably in attempt to avoid excessive tissue damage during this initial and crucial phase of the infection by *T. gondii*, reducing also possible extra damage caused by the chemotherapy.

Supporting this theory are the levels of IL-10, since it plays a key role in the regulation of many functions of the immune system by inhibiting the proliferation of B and T lymphocytes and inducing homeostasis in immune system responses (Arababadi *et al.*, 2010). Overlapping the results of day 4 p.i. for INF- γ and IL-10, it is possible to observe this correlation clearly, since in group C IL-10 was in its lower level (even inferior in comparison with group A) at the same time that IFN- γ was at its highest level among the groups under treatment. In groups F and G the levels of IL-10 were statistically increased when compared to group C, contrasting with statistical reduced levels of IFN- γ on the same comparison. Therefore, the association of DPDS with SSe generated a compensatory and protective mechanism, since they generated a balance between pro and anti-inflammatory responses, keeping the inflammatory reaction against the parasite, but with smaller magnitude, preventing extra tissue damage. Probably on day 20 p.i., the tissue levels of both antioxidants were low (as discussed above) causing the maintenance of IFN- γ levels equal among groups C, F and G. These three groups still with IFN- γ statistically elevated in comparison with group A probably because of the long-term treatment needed in toxoplasmosis, since according to Katlama *et al.*, (1996), if there is an interruption in a 4–6 week therapy, the disease can relapse.

Therefore, based on evidence that oxidative stress, defined as a persistent imbalance between the production of highly oxidative compounds and antioxidant defenses, leads to tissue damage and the antioxidant defense system has the function of inhibiting and/or reducing the damage caused by the deleterious free radicals and/or non-radical reactive oxygen species, our

results highlighted that inorganic (sodium selenite) and organic (diphenyl diselenide) forms of selenium associated with the ST (a common therapeutic choice in toxoplasmosis) were able to reduce the lipid peroxidation and protein oxidation mainly during the acute phase of the experimental infection, as well as it provided a immunologic balance between the production of pro and anti-inflammatory cytokines, avoiding over production of proinflammatory cytokines. Thereby, the maintenance of organic selenium levels could help in reducing damage by oxidative stress and exacerbated immune response in toxoplasmosis treatment, or even it can be considered as an auxiliary, potentially mechanisms of prevention against the disease.

References

- Arababadi, M.K., Mosavi, R., Khorramdelazad, H., Yaghini, N., Zarandi, E.R., Araste, M., Pourali, R., Nekhei, Z. and Kennedy, D.** (2010). Cytokine patterns after therapy with Avonex[®], Rebif[®], Betaferon[®] and CinnoVex[®] in relapsing-remitting multiple sclerosis in Iranian patients. *Biomarkers in Medicine* **4**,755-759.
- Arthur, J.R.**, (2000). The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**,1825-1835.
- Aspinall, T.V., Joynson, D.H., Guy, E., Hyde, J.E. and Sims P,F.** (2002). The molecular basis of sulfonamide resistance in *Toxoplasma gondii* and implications for the clinical management of toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases* **185**,1637-1643.
- Baatz, H., Mirshahi, A., Puchta, J., Gumbel, H. and Hattenbach, L.O.** (2006). Reactivation of Toxoplasma retinochoroiditis under atovaquone therapy in an immunocompetent patient. *Ocular Immunology and Inflammation* **14**,185-187.
- Boosalis, M.G.** (2008). The Role of selenium in chronic disease. *Nutrition in Clinical Practice* **23**,152-160.
- Brenneisen, P., Steinbrenner, H. and Sies, H.** (2005). Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Molecular Aspects of Medicine* **26**,256-267.
- Brezin, A. P., Kasner, L., Thulliez, P., Li, Q., Daffos, F., Nussenblatt, R.B. and Chan, C.C.** (1994). Ocular toxoplasmosis in the fetus: immunohistochemistry analysis and DNA amplification. *Retina* **14**,19-26.
- Butura, A., Nilsson, K., Morgan, K., Morgan, T.R., French, S.W., Johansson, I., Schuppe-Koistinen, I. and Ingelman-Sundberg, M.** (2009). The impact of CYP2E1 on the development of alcoholic liver disease as studied in a transgenic mouse model. *Journal of Hepatology* **50**,572-583.
- Carr, A., Tindall, B., Brew, B.J., Marriott, D.J., Harkness, J.L., Penny, R. and Cooper D.A.** (1992). Low-dose trimethoprim-sulphamethoxazole prophylaxis for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Annals of Internal Medicine* **117**,106-111.

- Cederbaum, A.I., Wu, D., Mari, M. and Bai, J.** (2001). CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells. *Free Radical Biology and Medicine* **31**,1539-1543.
- Chaudhuri, S., Varshney, J.P. and Patra, R.C.** (2008). Erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxides level and blood iron, zinc and copper concentrations in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. *Research in Veterinary Science* **85**,120-124.
- Cooper, D.Y., Levin, S., Narasimhulu, S. and Rosenthal, O.** (1965). Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science* **147**, 400-402.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R. and Milzani, A.** (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine* **9**,169-176.
- Dannemann, B., McCutchan, J.A., Israelski, D., Antoniskis, D., Leport, C., Luft, B., Nussbaum, J., Clumeck, N., Morlat, P., Chiu, J., Vilde, J.L., Orellana, M., Feigal, D., Bartok, A., Heseltine, P., Leedom, J. and Remington, J.** (1992). The California Collaborative Treatment Group. Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. A randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. *Annals of Internal Medicine* **116**, 33-43.
- Davies, K. J.** (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *The Journal of Biological Chemistry* **262**, 9895-9901.
- Davidson-York, D., Galey, F.D., Blanchard, P. and Gardner, I.A.** (1999). Selenium elimination in pigs after an outbreak of selenium toxicosis. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **11**, 352-357.
- Davies, K. J. and A.L. Goldberg.** (1987). Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *The Journal of Chemical Biology* **262**, 8220-8226.
- Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. and Davies, J.M.** (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical Journal* **324**, 1-18.
- Denkers, E.Y. and Gazzinelli, R.T.** (1998). Regulation and function of T-cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical Microbiology Reviews* **11**, 569-588.
- Derouin, F. and Chastany, C.** (1989). *In vitro* effects of folate inhibitors on *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**, 1753-1759.
- Dubey, J.P.** (2010). *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 313p.
- Esterbauer, H.** (1993). Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *American of Journal Clinical Nutrition* **57**, 779-785.
- Fleming, J., Ghose, A. and Harrison, P.R.** (2001). Molecular mechanisms of cancer prevention by selenium compounds. *Nutrition and Cancer* **40**, 42-49.
- Foulon, W., Villena, I. and Stray-Petersen, B.** (1999). Treatment of toxoplasmosis during pregnancy a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **180**, 410-415.
- Frenkel, J.K.** (1988). Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitology Today* **4**, 273-278.

- Frenkel, J. K. and Escajadillo, A.** (1987). Cyst rupture as a pathogenic mechanism of toxoplasmic encephalitis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **36**, 517-522.
- Ganther, H.E.** (2001). Selenium metabolism and mechanisms of cancer prevention. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **492**, 119-130.
- Gatkowska, J., Wieczorek, M., Dziadek, B., Dzitko, K. and Dlugonska, H.** (2012). Behavioral changes in mice caused by *Toxoplasma gondii* invasion of brain. *Parasitology Research* **111**, 53-58.
- Gazzinelli, R. T., Hakim, F.T., Hieny, S., Shearer, G.M. and Sher, A.** (1991). Opportunistic infections and retrovirus-induced immunodeficiency: studies of acute and chronic infections with *Toxoplasma gondii* in mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. *Infection and Immunity* **60**, 4394-4401.
- Gazzinelli, R., Xu, Y., Hieny, S., Cheever, A. and Sher, A.** (1992). Simultaneous depletion of CD41 and CD81 T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology* **149**, 175-180.
- Gazzinelli, R. T., Eltoun, I., Wynn, T.A. and Sher, A.** (1993). Acute cerebral toxoplasmosis is induced by *in vivo* neutralization of TNF- α and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *The Journal of Immunology* **151**, 3672-3681.
- Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hayashi, S., Denkers, E.Y., Hieny, S., Caspar, P., Trinchieri, G. and Sher, A.** (1994). Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology* **153**, 2533-2543.
- Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharton-Kersten, T., Cheever, A., Kuhn, R., Muller, W., Trinchieri, G. and Sher, A.** (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent upon CD41 T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ , and TNF- α . *The Journal of Immunology* **157**, 798-805.
- Grossman, P.L. and Remington, J.S.** (1979). The effect of trimethoprim and sulphamethoxazole on *Toxoplasma gondii* *in vitro* and *in vivo*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **28**, 445-455.
- Guengerich, F.P.** (2008). Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chemical Research in Toxicology* **21**, 70-83.
- Halliwell, B.** (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews* **52**, 253-265.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M.** (1999). Antioxidant defenses in Free radicals in biology and medicine. p., 105 – 245. Oxford University Press, New York.
- Heinecke, J. W., Li, W., Daehnke, H.L. and Goldstein, J.A.** (1993). Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 4069-4077.

- Hermes, C.L., Hausen, B.S., Sangoi, M.B., Almeida, T.C., Carvalho, J.A.M., Gomes, P. and Moresco, R.N.** (2013). An automated technique for the measurement of the plasma glutathione reductase activity and determination of reference limits for a healthy population. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **5**, 31-33.
- Hoffmann, P.R. and Berry, M.J.** (2008). The influence of selenium on immune responses. *Molecular Nutrition & Food Research* **52**, 1273-1280.
- Holland, G. N.** (2000). Ocular toxoplasmosis: new directions for clinical investigation. *Ocular Immunology and Inflammation* **8**, 1-7.
- Ip, C., Hayes, C., Budnick, R.M. and Ganther, H.E.** (1991). Chemical form of selenium, critical metabolites, and cancer prevention. *Cancer Research* **51**, 595–600.
- Johnson, L.L.** (1992). A protective role for endogenous tumor necrosis factor in *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and Immunity* **60**, 1979-1985.
- Kamerbeek, N. M., van, Z. R., de, B. M., Morren, G., Vuil, H., Bannink, N., Lincke, C., Dolman, K. M., Becker, K., Schirmer, R. H., Gromer, S. and Roos, D.** (2007). Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells. *Blood* **109**, 3560-3566.
- Katlama, C., De Wit, S., O’Doherty, E., Van Glabeke, M. and Clumeck, N.** (1996). Pyrimethamine–clindamycin vs. pyrimethamine–sulfadiazine as acute and long-term therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Clinical Infectious Diseases* **22**, 268-275.
- Kryukov, G.V., Castellano, S., Novoselov, S.V., Lobanov, A.V., Zehtab, O., Guigo, R. and Gladyshev, V.N.** (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* **300**, 1439-1443.
- Li, S., Cui, L., Zhao, J., Dai, P., Zong, S., Zuo, W., Chen, C., Jin, H., Gao, H. and Liu, Q.** (2011). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in female sterility patients in China. *The Journal of Parasitology* **97**, 529-530.
- Liu, T.Z., Lee, K.T., Chern, C.L., Cheng, J.T., Stern, A. and Tsai, L.Y.** (2001). Free Radical-Triggered Hepatic Injury of Experimental Obstructive Jaundice of Rats Involves Overproduction of Proinflammatory Cytokines and Enhanced Activation of Nuclear Factor κ B. *Annals of Clinical & Laboratory Science* **4**, 383-390.
- Lu, J. and Jiang, C.** (2005). Selenium and cancer chemoprevention: hypotheses integrating the actions of selenoproteins and selenium metabolites in epithelial and non-epithelial target cells. *Antioxidants & Redox Signaling* **7**, 1715-1727.
- Luft, B.J., Brooks, R.G., Conley F.G., McCabe, R.E. and Remington, J.S.** (1984). Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *The Journal of the American Medical Association* **252**, 913-917.
- Mahan, D.C., Cline, T.R. and Richert, B.** (1999). Effects of dietary levels of selenium enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics and loin quality. *Journal of Animal Science* **77**, 2172–2179.

- Mahmoud, K.Z. and Edens, F.W.** (2003). Influence of selenium sources on age related and mild heat stress-related changes of blood and liver glutathione redox cycle in broiler chickens (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B. Biochemistry & Molecular Biology* **136**, 921–934.
- Meotti, F.C., Borges, V.C., Zeni, G., Rocha, J.B. and Nogueira, C.W.** (2003). Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. *Toxicology Letters* **143**, 9-16.
- Mordue, D.G., Monroy, F., La Regina, M., Dinarello, C.A. and Sibley L.D.** (2001). Acute Toxoplasmosis Leads to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines. *Immunology* **167**, 4574-4584.
- Mugesh, G., du Mont, W.W. and Sies, H.** (2001). Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chemical Reviews* **101**, 2125-2179.
- Naithani, R.** (2008). Organoselenium compounds in cancer chemoprevention. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **8**, 657-668.
- Nebert, D.W. and Dalton, T.P.** (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* **6**, 947-960.
- Nogueira, C.W., Meotti, F.C., Curte, E., Pilissao, C., Zeni, G. and Rocha, J.B.** (2003). Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* **183**, 29-37.
- Nohl, H., Esterbauer, H. and Evans, C.R.** (1996). Free radicals in the environment, medicine and toxicology: critical aspects and current highlights. *Free Radicals Biological Medicine* **20**, 765-766.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.** (1978). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* **95**, 351-358.
- Papp, L.V., Lu, J., Holmgren, A. & Khanna, K.K.** (2007). From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxidants & Redox Signaling* **9**, 775-806.
- Petersen, D.R. and Doorn, J.A.** (2004). Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radical Biology and Medicine* **37**, 937-945.
- Prigol, M., Schumacher, R.F., Nogueira, C.W. and Zeni, G.** (2009). Convulsant effect of diphenyl diselenide in rats and mice and its relationship to plasma levels. *Toxicology Letters* **189**, 35-39.
- Rayman, M.P.** (2005). Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society* **64**, 527-542.
- Rayman, M.P.** (2008). Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *British Journal of Nutrition* **100**, 254-268.
- Roberts, F. and McLeod, R.** (1999). Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitology Today* **15**, 51-57.

- Rossato, J.I., Ketzer, L.A., Centuriao, F.B., Silva, S.J., Ludtke, D.S., Zeni, G., Braga, A.L., Rubin, M.A. and Rocha, J.B.** (2002). Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochemical Research* **27**, 297-303.
- Schattenberg, J.M., Wang, Y., Rigoli, R.M., Koop, D.R. and Czaja, M.J.** (2004). CYP2E1 overexpression alters hepatocyte death from menadione and fatty acids by activation of ERK1/2 signaling. *Hepatology* **39**, 444-455.
- Scharton-Kersten, T. M., Wynn, T.A., Denkers, E.Y., Bala, S., Showe, L., Grunvald, E., Hieny, S., Gazzinelli, R.T. and Sher, A.** (1996). In the absence of endogenous IFN- γ mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *The Journal of Immunology* **157**, 4045-4054.
- Schewe, T.** (1995). Molecular actions of ebselen - an antiinflammatory antioxidant. *General Pharmacology* **26**, 1153-1169.
- Seko, Y., Saito, Y., Kitahara, J. and Imura, N.** (1989). Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione in vitro. In: Wendel, A. (Ed.), *Selenium in Biology and Medicine*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 70-73.
- Sies, H.** (1993). Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radical Biology and Medicine* **14**, 313-323.
- Smit, A.J. and Lutgers, H.L.** (2004). The clinical relevance of advanced glycation endproducts (AGE) and recent developments in pharmaceuticals to reduce AGE accumulation. *Current Medicinal Chemistry* **11**, 2767-2784.
- Spallholz, J.E.** (1994). On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radical Biology and Medicine* **17**, 45-64.
- Suzuki, Y., Conley, F.K. and Remington, J.S.** (1989). Importance of endogenous IFN- γ for the prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *The Journal of Immunology* **143**, 2045-2050.
- Tenter, A.M., Heckerroth, A.R. and Weiss, L.M.** (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* **30**, 1217-1258.
- Thomas ,H.V., Thomas, D.R., Salmon, R.L., Lewis, G. and Smith, A.P.** (2004). *Toxoplasma* and *coxiella* infection and psychiatric morbidity: a retrospective cohort analysis. *BMC Psychiatry* **4**, 32.
- Thum, T. and Borlak, J.** (2002). Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *FASEB J* **16**, 1537-1549.
- Tonin,A.A., Da Silva, A.S., Costa, M.M., Otto, M.A., Thomé, G.R., Tavares, K.S., Miletto, L.C., Leal, M.R., Lopes, S.T.A., Mazzanti, C.M., Monteiro, S.G. and de la Rue, M.L.** (2011). Diminazene aceturate associated with sodium selenite and vitamin E in the treatment of *Trypanosoma evansi* infection in rats. *Experimental Parasitology* **128**, 243-249.
- Vermeulen, A.N.** (1998). Progress in recombinant vaccine development against coccidiosis. A review and prospects into the next millennium. *International Journal for Parasitology* **28**, 1121-1130.

- Wen, X., Wang, J.S., Backman, J.T., Laitila, J. and Neuvonen, P.J.** (2002). Trimethoprim and sulfamethoxazole are selective inhibitors of CYP2C8 and CYP2C9, respectively. *Drug Metabolism and Disposition* **30**, 631-635.
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Nguyen Khoa, T., Capeillere-Blandin, C., Nguyen, A.T., Canteloup, S., Dayer, J.M., Jungers, P., Druke, T. and Descamps-Latscha, B. (1998).** Advanced oxidation protein products as a novel mediators of inflammation and monocyte activation in a chronic renal failure. *The Journal of Immunology* **161**, 2524-2532.
- Wong, S. and Remington, J.S.** (1994). Toxoplasmosis in pregnancy. *Clinical Infectious Diseases*.**18**, 853-861.
- Wu, D. and Cederbaum, A.I.** (2001). Removal of glutathione produces apoptosis and necrosis in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **25**, 619-628.
- Yuan, Z., Gao, S., Liu, Q., Xia, X., Liu, X., Liu, B. and Hu, R.** (2007). *Toxoplasma gondii* antibodies in cancer patients. *Cancer Letters* **254**, 71-74.

Table 1. Mean and standard deviation of the longevity and mortality using treatment with Bactrim[®] F, sodium selenite and diphenyl diselenide mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*.

GROUPS	LONGEVITY (Days)	⁺MORTALITY (n)
A: Uninfected	20.0 ^a (± 0.0)	0/6
B: Infected and not treated	4.0 ^c (± 0.8)	6/6
C: Infected + Sulfamethoxazole/Trimethoprim (ST)	11.3 ^b (± 9.5)	3/6
D: Infected + sodium selenite (SSe)	4.0 ^c (± 0.9)	6/6
E: Infected + diselenide disulfide (DPDS)	5.0 ^c (± 0.8)	6/6
F: Infected and treated + association ST + SSe	17.1 ^{ab} (± 6.9)	1/6
G: Infected and treated + association ST + DPDS	17.0 ^{ab} (± 7.3)	1/6

Note: Results are the mean ± standard deviation. Results followed by the same letters in the same column do not differ significantly in *t* test.

⁺Mice dead during the study.

* Mice that survived and were apparently healed after 20 days of study.

Table 2. Levels of INF- γ and IL-10 in mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii* on days 4 and 20 post infection

GROUP	INF- γ		IL-10	
	DAY 4	DAY 20	DAY 4	DAY 20
A	99.2 ^d (\pm 6.8)	96.0 ^b (\pm 7.0)	94.2 ^b (\pm 9.1)	103.7 ^c (\pm 8.5)
B	367.7 ^a (\pm 62.7)	-	37.5 ^d (\pm 5.4)	-
C	310.2 ^b (\pm 16.6)	177.7 ^a (\pm 11.0)	78.8 ^c (\pm 8.0)	91.0 ^c (\pm 7.8)
D	358.2 ^a (\pm 72.4)	-	35.4 ^d (\pm 4.9)	-
E	389.7 ^a (\pm 67.1)	-	39.1 ^d (\pm 7.2)	-
F	197.8 ^c (\pm 17.0059)	188.0 ^a (\pm 11.5)	102.2 ^b (\pm 7.8)	134.2 ^b (\pm 6.2)
G	208.0 ^c (\pm 21.0238)	174.4 ^a (\pm 12.3)	129.0 ^a (\pm 3.8)	153.0 ^a (\pm 5.8)

Note: Results are the mean \pm standard deviation. Results followed by the same letters in the same column do not differ significantly in *t* test.

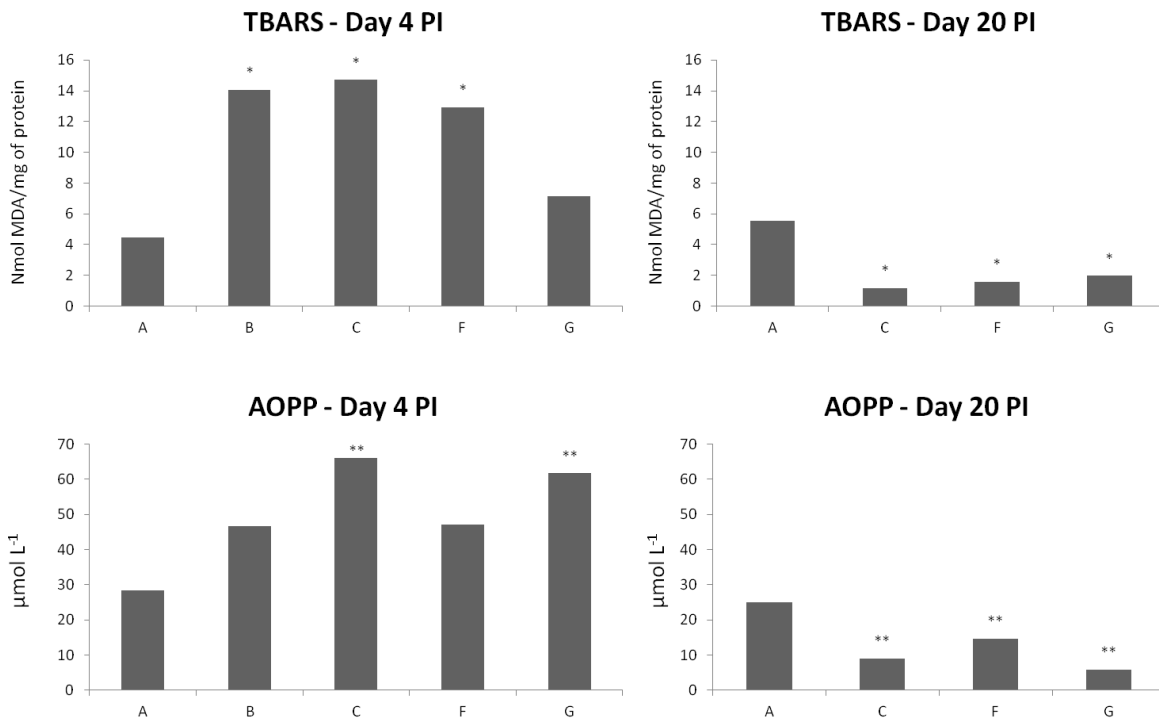


Figure 1: Levels of TBARS (1-A) and AOPP (1-B) in liver of mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*, RH strain, on day 4 and 20 p.i., when compared to non-infected animals (* $P < 0.05$; ** $P < 0.001$).

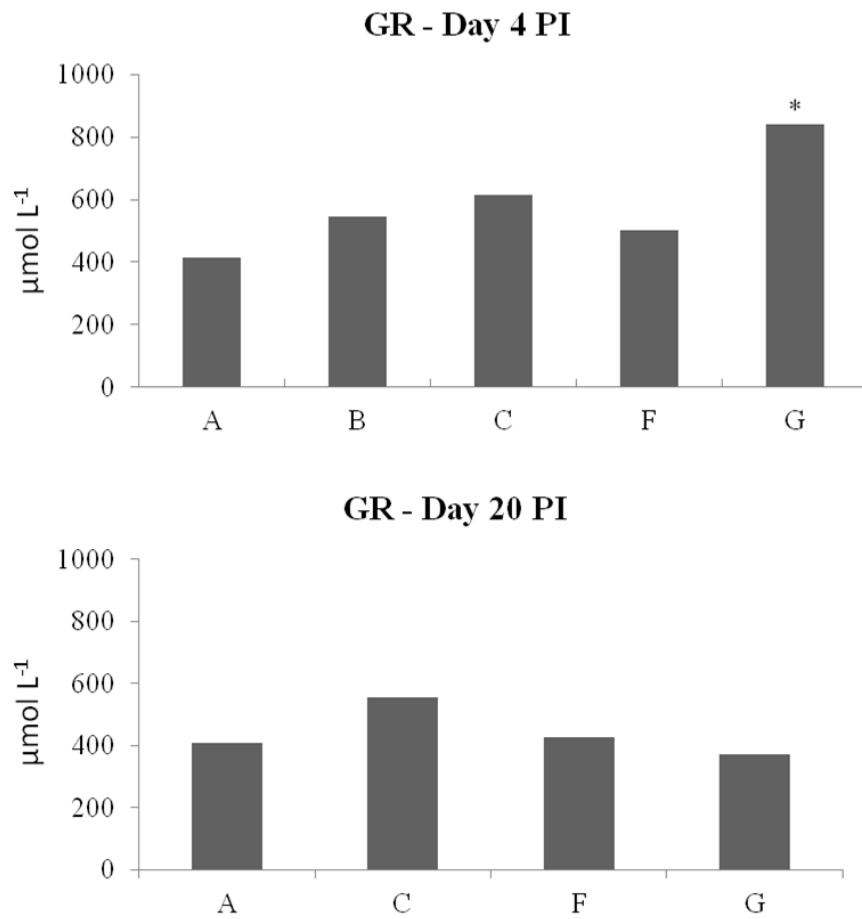


Figure 2: Levels of glutathione reductase (GR) in liver of mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*, RH strain, on day 4 and 20 p.i., when compared to non-infected animals (*P < 0.05).

4. CONCLUSÃO

Portanto, com base na evidência de que o stress oxidativo, definido como um desequilíbrio entre a produção persistente de compostos altamente oxidativos e defesas antioxidantes, conduz a danos nos tecidos, bem com o fato de que o sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos provocados pelas espécies reativas, nossos resultados evidenciaram que o selênio nas suas formas inorgânica (selenito de sódio) e orgânica (disseleneto de difenila) associado à sulfametoxazol e trimetoprima (a escolha terapêutica comum em toxoplasmose) foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica e proteica principalmente durante a fase aguda da nossa infecção experimental, assim como esta associação proporcionou um equilíbrio imunológico entre a produção de citocinas pro e anti-inflamatórias, evitando danos teciduais geralmente causados por respostas inflamatórias exacerbadas. Deste modo, a manutenção de níveis fisiológicos de selênio pode ajudar na redução dos danos por stress oxidativo e na modulação da resposta imune no tratamento da toxoplasmose, ou até mesmo pode ser considerado como uma terapia auxiliar, potencialmente mecanismos de prevenção contra a doença.

REFERÊNCIAS

- AMATO NETO, V.; MARCHI, C. R. Toxoplasmose. In: Cimerman, B. & Cimerman, S. ed. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. 2. ed. São Paulo, Atheneu, p. 160-177, 2002.
- APPLEFORD, P. J.; SMITH, J. E. Strain and stage specific variation in *Toxoplasma gondii* antigens. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1187-1191, 2000.
- ARAÚJO, W. N., SILVA, A.V., LANGONI, H. Toxoplasmose: uma zoonose – realidades e riscos. **Revista Cães e Gatos**, v. 79, n. 1, p. 20-27, 1998.
- ASPINALL, T. V. et al. The molecular basis of sulfonamide resistance in *Toxoplasma gondii* and implications for the clinical management of toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases** 185, 1637–1643, 2002.
- BAATZ, H. Reactivation of *Toxoplasma retinochoroiditis* under atovaquone therapy in an immunocompetent patient. **Ocular Immunology and Inflammation** 14, 185–187, 2006.
- BIOCCA, E. Alcune considerazioni sulla sistematica dei protozoi e sulla utilita di creare una nuova classe di protozoi. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 8, p. 91-102, 1956.
- BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. **Infectious & Immunology**. v. 61, n.3, p.1141-1145, 1993.
- BOOSALIS ,M. G. The role of selenium in chronic disease. **Nutrition in Clinical Practice** 23, 152–160, 2008.
- BUONOCORE, G.; Perrone, G.; Perrone, S. et al. Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. **Pediatric Research**, v.52, n.1, p.46-49, 2002.
- CARR, A. ET AL. Low-dose trimethoprim-sulphamethoxazole prophylaxis for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. **Annals of Internal Medicine** 117, 106–111, 1982.
- CHA, D.Y., et al. Effects of specific monoclonal antibodies to dense granular proteins on the invasion of *Toxoplasma gondii* *in vitro* and *in vivo*. **Korean Journal of Parasitology**. v. 39, n.3, p. 233-240, 2001.
- CORCUERA, M. T.; LOZANO, J.; LOPEZ, R. F. Estudio comparativo de lãs distintas técnicas serológicas utilizadas para el diagnóstico de La toxoplasmosis. **Revista de Sanidad e Higiene Pública**, n. 55, p. 1045-1059, 1981.

- CORRUTHERS, V. B.; SUZUKI, Y. Effects of *Toxoplasma gondii* Infection on the Brain. **Schizophrenia Bulletin**, v. 33, n. 3, p. 745-751, 2007.
- DANNEMANN, B. et al. The California Collaborative Treatment Group. Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. A randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. **Annals of Internal Medicine** 116, 33–43, 1992.
- DARDÉ, M. L.; AJZENBERG, D. Le polymorphisme du toxoplasme et ses conséquences cliniques. **Archives de Pédiatrie**, v. 10, p. 45-46, 2003.
- DENEKE, S.; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. **The American Journal of Physiology**, v. 257, n.4, p.163-173, 1989.
- DEROUIN, F.; CHASTANY, C. *In vitro* effects of folate inhibitors on *Toxoplasma gondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 33, 1753–1759, 1989.
- DIANA, J. et al. Migration and maturation of human dendritic cells infected with *Toxoplasma gondii* depend on parasite strain type. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 321-331, 2004.
- DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. **Journal of Protozoology**, v. 23, n. 4, p. 537-546, 1976.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals*, p. 101-237. In J. P. Kreier (ed.), *Parasitic protozoa*, 3rd ed. Academic Press, Inc., New York, N.Y, 1977.
- DUBEY, J. P. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals*, p. 1–158. In J. P. Kreier (ed.), *Parasitic protozoa*, 6th. ed. Academic Press, Inc., New York, N.Y, 1993.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n. 11, p. 1593-1598, 1994.
- DUBEY, J. P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p. 65-70, 1996.
- DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998.
- DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 2, p. 121-153, 2002.

- DUBEY, J. P. et al. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **The Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 851-853, 2003.
- EL-ON, J; PEISER, J. Toxoplasma and toxoplasmosis. **Harefuah**, v.142, p.48- 55, 2003.
- ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **American Journal of Clinical Nutrition** 57, 779-785, 1993.
- FERREIRA, A.L.A. et al. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p. 61-68, 1997.
- FERGUSON, D. J.; HUTCHISON, W.M. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. **Virchows Archives**, v. 411, n. 1, p. 39-43, 1987a.
- FERGUSON, D. J.; HUTCHISON, W.M. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. **Parasitology Research**, v. 73, n. 6, p. 483-491, 1987b.
- FLEMING, J.; GHOSE, A; HARRISON, P.R. Molecular mechanisms of cancer prevention by selenium compounds. **Nutrition and Cancer** 40, 42-49, 2001
- FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Ícone, p. 139-143, 1997.
- FRENKEL, J. K. et al. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, p. 893-896, 1970.
- FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis: parasite, life cycle, pathology and immunology. In: The Coccidia: *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma* and related genera. **University Park Press**. p. 343-410, 1973.
- FREYRE, A. et al. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. **Journal of Parasitology**, v. 75, n. 5, p. 750-755, 1989.
- GANTHER, H.E. Reduction of the selenotrisulfide derivative of glutathione to a persulfide analog by glutathione reductase. **Biochemistry**, v.10, n.22, p.4089-4098, 1971.
- GABRIELSEN, B.O.; OPSTVEDT, J. Availability of selenium in fish meal in comparison with soybean meal, corn gluten meal and selenomethionine relative to selenium in sodium selenite for restoring glutathione peroxidase activity in selenium-depleted chicks. **Journal of Nutrition**, v.110, n.6, p.1096-1100, 1980.
- GRIGG, M. E. et al. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **Journal of Infection Disease**, v. 184, n. 5, p. 633-639, 2001.

GROSSMAN, P. L.; REMINGTON, J.S. The effect of trimethoprim and sulphamethoxazole on *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 28, 445–455, 1979.

HALLIWELL, B. & CUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4^a, New York: Oxford University Press, 2008.p.

HOFFMANN, P.R.; BERRY, M. J. The influence of selenium on immune responses. **Molecular Nutrition and Food Research** 52, 1273–1280, 2008.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561-1566, 1995.

KALOUSOVÁ, M. et al. Advanced glycation end – products and advanced oxidation protein products in Patients with Diabetes mellitus. **Physiological Research**, v.51,n.6, p.597-604, 2002.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: Neves, D. P. **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu. 149-156, 2002.

KELLY, C. J. et al. Altered vascular function in young women with polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v.87, n.2, p.742-746, 2002.

KHAN, A. et al. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 942-949, 2006.

LANG, C.; GROSS, U.; LÜDER, C.G. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**. v.100, n.2, p.191-203, 2006.

LEGER, L.; DUBOSCQ, O. *Selenococcidium intermedium* Leg. et Dub. et la systematiques des sporozoaires. **Archives de zoologie expérimentale et générale**. v. 5, p. 187-238, 1910.

LEGER, L. *Caryospora simplex*, coccidie monosporee et la classification des coccidies. **Archives in Protistenk**, v. 22, p. 71-86, 1911.

LEUCKART, R. **Die Parasiten des Menschen**. 2nd ed. G. F. Winter, Leipzig, 344 p., 1879.

LU, J.; JIANG, C. Selenium and cancer chemoprevention: hypotheses integrating the actions of selenoproteins and selenium metabolites in epithelial and non-epithelial target cells. **Antioxidants and Redox Signaling** 7, 1715–1727, 2005.

MARKESBERY, W.R. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v.23, n.1, p. 134-147, 1997.

McEVOY, G.K. (Ed.). **AHFS drug information** 2007. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, 2007.

- MEAD P.S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Disease**, v. 5, p. 607–24, 1999.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v.52, p.711–760, 1983.
- MILLER, J. B. Zoonoses de pequenos animais. In: ETTINGER, S.J & FELDMAN, E.C. (Eds.). **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 1. edição. São Paulo: Manole, Cap. 65, vol. 1, 1495, p., 1997.
- NAITHANI, R. Organoselenium compounds in cancer chemoprevention. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry** 8, 657–668, 2008.
- NAVARRO, J. et al. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumor growth *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n.3-4, p.410-418, 1999.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, p. 174-187, 1995.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'Académie des Sciences**. v. 147, p. 763-766, 1908.
- NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'Académie des Sciences** v. 148, p. 369-372, 1909.
- NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide a janus-faced molecule. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 11, p. 2055-2071, 2010.
- NOHL, H., ESTERBAUER, H.; EVANS, C.R. Free radicals in the environment, medicine and toxicology: critical aspects and current highlights. **Free Radicals Biology Medicine** 20, 765-766, 1996.
- OBERLEY, T.D.; OBERLEY, L.W. Antioxidant enzyme levels in cancer. **Histology and Histopathology**, v. 12, n.2, p.525-535, 1997.
- PASSOS, L.N.; ARAUJO FILHO, O.F.; ANDRADE Jr., H.F. *Toxoplasma* encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, p. 141-145, 2000.
- PAVIA, C.S. Protection against experimental toxoplasmosis by adoptive immunotherapy. **Journal of Immunology**. v.137, n.9, p. 2985-2990, 1986.
- PEYRON, F., et al. Treatments for toxoplasmosis in pregnancy. Cochrane Database of Systematic Reviews. In: **The Cochrane Library**, Issue 9, 2010.

- PEYRON, F. & WALLON, M. Options for the pharmacotherapy of toxoplasmosis during pregnancy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 2, n.8, p.1269- 1274, 2001.
- POCHE, F. Das System der Protozoa. **Archives in Protistenk.** v. 30, p. 125-321, 1913.
- RAYMAN, M.P. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. **Proceedings of the Nutrition Society** 64, 527–542, 2005.
- REED, T. T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 7, p. 1302-1319,. 2011.
- ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.
- ROOS, D. S. et al. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Methods in Cell Biology**, v. 45, p. 27-63. 1994.
- ROSSATO, J. I., et al. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. **Neurochemical Research**, v. 27, n. 4, p. 297-303, 2002.
- SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. **Radicais Livres e a Resposta Celular ao Estresse Oxidativo**. Canoas: Ed. Ulbra, 2004.204 p.
- SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.
- SORRENTINO, A. H. HLA class II involvement in HIV- associated Toxoplasmic encephalitis development. **Clinical Immunology**, v.115, p. 133-137, 2005.
- SPLENDORE, A. Un nuovo protooz parassita de'conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malatti che ricorda in molti punti il Kala - azar dell'umo. Nota prelinaire pel, **Revista Social Ciência e Medicina**, v. 03, p. 109, 1908.
- SHAW, C. A. **Glutathione in Nervous System**. Washington: Taylor and Francis, 1998.102 p.
- SURAI, P. F. **Selenium in Nutrition and Health**. 1st ed. Nottingham University Press. Nottingham. 2006. 176p.
- VERMEULEN, A. N. Progress in recombinant vaccine development against coccidiosis. A review and prospects into the next millennium. **International Journal for Parasitology** 28, 1121–1130, 1998.
- VILLENA, I. et al. *Toxoplasma* strain type and human disease: risk of bias during parasite isolation? **Trends Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 160-162, 2004.

WEISS, L. M.; KIM, K. *Toxoplasma gondii*. The model Apicomplexan: Perspectives and Methods. Elsevier, Burlington (US), 801p., 2007.

WEBB, C. & TWEDT, D. Oxidative stress and liver disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, n. 1, p. 125-135, 2008.

WITKO-SARSAT, V. et. Advanced oxidation protein products as a novel mediators of inflammation and monocyte activation in a chronic renal failure. **Journal of Immunology** 161, 2524-2532, 1998.

WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 7, p. 299-316, 1993.

ZICKER, S. C.; WEDEKIND, K. J.; JEWELL, D. E. Antioxidants in veterinary nutrition. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 36, n. 6, p. 1183-1198, 2006.

ANEXOS