

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Ação da azitromicina em vilos placentários humanos infectados por
Toxoplasma gondii: um modelo experimental de tratamento da
toxoplasmose congênita**

LETÍCIA DE SOUZA CASTRO FILICE

**Uberlândia
Janeiro – 2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Ação da azitromicina em vilos placentários humanos infectados por
Toxoplasma gondii: um modelo experimental de tratamento da
toxoplasmose congênita**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor

Aluna: Letícia de Souza Castro Filice

Orientadora: Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro

Coorientadora: Dra. Neide Maria da Silva

Uberlândia
Janeiro – 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F482a Filice, Letícia de Souza Castro, 1973-
2013 Ação da azitromicina em vilos placentários humanos infectados por
Toxoplasma gondii : um modelo experimental de tratamento da
toxoplasmose congênita / Letícia de Souza Castro Filice. – 2013.
100 p. : il.

Orientadora: Eloísa Amália Vieira Ferro
Coorientadora: Neide Maria da Silva

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Toxoplasmose congênita – Tratamento -
Teses. 3. Azitromicina -- Teses. I. Ferro, Eloísa Amália Vieira. II. Silva,
Neide Maria da. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
E-Mail: coipa@ufu.br - Telefax: www.imunoparasito.ufu.br (034)3218-2333



Letícia de Souza Castro Filice

“Ação da azitromicina em vilos placentários humanos infectados por *Toxoplasma gondii*: Um modelo experimental de tratamento da toxoplasmose congênita”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 11 de janeiro de 2013.

Prof. Dra. Sonia Maria Oliani
UNESP

Prof. Dr. Tiago Wilson P. Mineo
ICBIM/UFU

Prof. Dra. Maria Célia dos Santos
FAMED/UFU

Prof. Dra. Karine Rezende de Oliveira
UFU/CAMPUS PONTAL

Prof. Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro – orientadora
ICBIM/UFU

*“Renda-se como eu me rendi.
Mergulhe no que você não conhece,
como eu mergulhei.
Pergunte, sem querer, a resposta,
como estou perguntando.
Não se preocupe em ‘entender’.
Viver ultrapassa todo o entendimento ”*

Clarice Lispector

Aos meus amores...

Lorena e Valentina,

Minhas princesas, sou grata, acima de tudo, pelo inestimável apoio que preencheu minhas diversas falhas, pela paciência, compreensão e ternura sempre manifestadas apesar da falta de atenção e ausências. Pela excitação e orgulho com que sempre reagiram aos resultados conquistados... espero que o entusiasmo, paixão e empenho que dedico ao trabalho lhes possa servir de estímulo para fazerem sempre mais e melhor... Amo vocês!!!!

“Eu sem vocês não tenho porque...”

Marcelo,

“Alma gêmea de minh´alma...” Sem você nada disso seria possível!
Obrigada pelo apoio e paciência nos momentos de inquietação e cansaço.
Com você exercito o amor... *“Flor de luz de minha vida!”*



Bendita és tu Mulher, Cheia de graça!
Bendito é o fruto do teu ventre
Óvulo fecundado,
Semente da vida,
Amor que germinou
Brotando luz!
Fonte luminosa que irradia
A magia prenhe de alegria
Na gestação do feto
Abençoado e coberto
Por pétalas de rubra rosa
Sangue misturando sangue
Bombeado do coração
Viva emoção Na formação do outro ser,
Essência indivisível E eterna,
Presente e presença de Deus,
Gerador de felicidade,
Vínculo sangüíneo,
Descendência, Posteridade!
Botão a se abrir Em flor
Nesta selva de concreto
Tingindo o cinza,
No verde esperança
Na evolução do feto-criança!

(Carmen Vervloet)

AGRADECIMENTOS

O Doutorado é uma experiência enriquecedora e de total superação. Modificamo-nos a cada tentativa de buscar respostas às nossas curiosidades e aflições de “pesquisador”. O final deste trabalho me traz muita felicidade pela realização de um sonho de uma vida e um objetivo construído ao longo de quase quatro anos. Os agradecimentos se transformam num momento de dividir esta alegria com pessoas especiais que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para alcançá-lo. E é a essas pessoas que gostaria de agradecer:

À professora Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro, minha orientadora e amiga...

Muitíssimo obrigada por ter me recebido com tanto carinho em seu laboratório, por ter me apresentado ao mundo maravilhoso da gestação e pela paciência com minhas limitações (sair da cavidade bucal para a placenta não foi muito fácil!). E, principalmente, por acreditar em mim e sempre me mostrar um caminho quando achava que estava perdida. Obrigada pelas conversas, pelos conselhos e orientação de vida. Levarei eternamente comigo seu exemplo e minha gratidão.

À Dr^a. Neide Maria da Silva,

Pela competência científica e coorientação do trabalho, pela disponibilidade, oportunidades, amizade e generosidade reveladas ao longo destes anos de trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

À Dr^a. Deise Aparecida de Oliveira Silva.

Obrigada pelas idéias para melhorar o trabalho, pelas reações de ELISA e por sua gentileza, disponibilidade e seriedade. Tenho você como uma referência de ser humano e eficiência profissional!

Ao Dr. Marco Aurélio Rodrigues,

Pela amizade incondicional. Esta vitória também é sua... Seu incentivo e apoio foram fundamentais!!!

Aos meus pais e irmãos a quem devo tudo.

Obrigada, por serem a minha base em todos os momentos. Amo vocês!

Aos meus sogros Ricardo e Maria Inês Felice,

Obrigada pelo carinho, apoio e torcida!

Aos amigos da imunologia,

Em especial ao Dr. Tiago Mineo e Ana Cláudia por me ajudarem sempre que precisei, pelos reagentes cedidos e equipamentos disponibilizados.

Minhas amigas e companheiras de Laboratório:

Angélica, Bellisa, Mariana... *“amigo é coisa pra se guardar debaixo de sete chaves...”* Apreendi muito com vocês! Obrigada pela paciência, cumplicidade e generosidade. Vocês são amigas queridas, especiais e meus eternos exemplos de dedicação e amizade!

Priscila, Andressa, Celene, Mayara, Janice e Pâmela. Amigas maravilhosas... Pelos momentos de descontração, auxílio nos experimentos, conversas e confidências.

Aos meus grandes amigos do IMPAT:

Paulo Vitor, Romulo, Ester Cristina, Loyane, Mário, Layane, Poliana e Karine, foi um privilégio estar ao lado de pessoas tão incríveis como vocês. Meu sincero obrigado!

À Dra Maria Célia e equipe do Centro obstétrico do Hospital de Clínicas.

Obrigada pela atenção e pelas portas abertas. Um obrigado especial à Mary Ângela, Alderi, Gina, Ana, Emília e tantas outras que sempre me ajudaram na coleta das placentas com disposição e um sorriso no rosto!

Ao setor de Hormônios do Laboratório de Análises Clínicas da UFU,

Obrigada pelo carinho e por embarcarem comigo na padronização da análise de um material tão diferente do de vocês, disponibilizando equipamentos, reagentes e principalmente seu tempo precioso!

Aos amigos da Histologia:

Fabício, Jucélia, Eliete, Mariane, Rui e Rosiane, o sorriso de vocês iluminou os meus dias. Meu carinho e agradecimento!

Aos professores da Histologia,

Em especial ao Dr. Marcelo Belleti, Dra Paula Dechichi e Dra Karen Hiraki. Obrigada pelo acolhimento, amizade e apoio.

Aos amigos Dr. Antonio Wilson e Dra. Maria Lúcia Prada de Almeida,

Sou privilegiada, não tenho apenas pais biológicos! Mas como agradecer um tudo? Desde o início, sempre presentes em minha vida acadêmica e pessoal, estimulando, oportunizando, apoiando... Amo vocês!!!

Às secretárias da Pós-Graduação, Lucileide e Lucélia.

Obrigada pela atenção e disponibilidade em ajudar.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho;

A CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

*“Quando se sonha sozinho é apenas um sonho.
Quando se sonha junto é o começo da realidade”.*
D. Quixote

A todos que não estão citados aqui, mas de alguma forma contribuíram para realização deste sonho, obrigada!!!!

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUÇÃO.....	15
1. <i>Toxoplasma gondii</i>	15
2. Imunidade contra o <i>Toxoplasma gondii</i>	17
3. Toxoplasmose na gestação.....	20
4. A imunologia da gestação	23
5. Regulação hormonal da gestação.....	27
6. Tratamento da toxoplasmose congênita	30
6.1. Pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico	32
6.2. A azitromicina.....	34
7. Modelo de estudo com vilos placentários	37
OBJETIVOS.....	39
1. Objetivos Específicos.....	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
1. Manutenção de células BeWo em cultura para manutenção de <i>T. gondii</i>	40
2. Manutenção <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> da cepa RH e do clone RH 2F1 de <i>T. gondii</i>	40
3. Ensaio de invasão e proliferação.....	42
4. Cultura de explantes de vilos placentários humanos.....	43
5. Antibióticos.....	44
6. Análise de citotoxicidade.....	45

7. Ensaio de proliferação com clone RH 2F1 de <i>T. gondii</i>	46
8. Imuno-histoquímica para a detecção de taquizoítas.....	47
9. Dosagem protéica dos vilos placentários.....	48
10. Detecção de citocinas.....	48
10.1: Dosagem de IL-12, TNF- α , IL-10 e TGF- β 1 por <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	48
10.2: Dosagem de citocinas de perfil Th1/Th2 e IL-17A por citometria de fluxo.....	50
11. Ensaio de eletroquimioluminescência para dosagem de estradiol, progesterona e hCG+ β	51
12. Dosagem de Nitrito.....	52
13. Tratamento prévio com antibióticos do clone RH 2F1 de <i>T. gondii</i>	52
14. Análise estatística.....	53
RESULTADOS.....	54
1. Parasitos da cepa RH e o clone RH 2F1 de <i>T. gondii</i> apresentaram similares índices de invasão e proliferação	54
2. Toxicidade tecidual após infecção com <i>T. gondii</i> e tratamento com antibióticos.....	55
3. Vilos placentários infectados e tratados com azitromicina ou PSA apresentaram menor índice de parasitismo tecidual.....	56
4. Perfil da produção de citocinas produzidas por vilos placentários infectados e tratados com azitromicina ou PSA.....	56
5. Perfil da produção de estradiol, progesterona e hCG+ β em vilos placentários.....	61
6. Produção de Nitrito.....	62

7. O tratamento prévio de taquizoítas de <i>T. gondii</i> com azitromicina ou PSA reduziu a infecção em vilos placentários	62
DISCUSSÃO.....	64
FIGURAS.....	74
CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
ANEXOS.....	96

RESUMO

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. Apesar de geralmente apresentar-se como uma infecção assintomática, a toxoplasmose pode manifestar-se como uma doença potencialmente grave em indivíduos imunocomprometidos e quando adquirida durante a gestação, pode associar-se a complicações fetais e abortos. O tratamento da toxoplasmose durante a gestação, caso haja confirmação da infecção fetal, baseia-se na combinação das drogas: pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico (PSA). No entanto, estes fármacos apresentam inúmeros efeitos adversos, não devendo ser indicado no primeiro trimestre gestacional. A azitromicina é um antibiótico azalídeo com ação em uma ampla gama de infecções bacterianas, bem como atividade antimalárica, sendo considerado seguro para utilização durante a gestação. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia da azitromicina no controle de *T. gondii* usando o modelo experimental de explantes placentários de terceiro trimestre. Os vilos placentários foram infectados ou não com taquizoítas de *T. gondii* e tratados com diferentes concentrações de azitromicina ou PSA. Esses vilos placentários foram processados para análise morfológica, ensaio de proliferação de *T. gondii* e imuno-histoquímica e, os sobrenadantes, avaliados para mensuração da atividade de LDH, dosagem de citocinas, produção hormonal e de nitrito. Em doses não citotóxicas (200 e 1000 µg/ml), os tratamentos com azitromicina ou PSA não alteraram a morfologia dos vilos placentários. Ambos tratamentos foram capazes de reduzir significativamente a proliferação intracelular *T. gondii*, sendo que o tratamento com PSA promoveu aumento de IL-12 e redução de IL-10, enquanto a azitromicina induziu aumento na produção de IL-2 e IL-6 nos grupos infectados com *T. gondii*, além de redução na produção dos hormônios estradiol, progesterona e hCG. Além disso, o tratamento prévio dos parasitos com antibióticos foi capaz de controlar a replicação dos mesmos, demonstrando ação direta das drogas sobre *T. gondii*. Assim, nossos dados indicam que a azitromicina, assim como PSA, são capazes de controlar a infecção por *T. gondii* nos vilos placentários humanos de terceiro trimestre gestacional. Além disso, nossos dados sugerem a azitromicina como uma alternativa no tratamento da toxoplasmose congênita, ampliando as estratégias terapêuticas utilizadas no controle do parasito na interface materno fetal.

Palavras-chave: azitromicina, vilos placentários humanos, trofoblasto, citocinas, hormônios sexuais, *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a worldwide zoonosis, caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*. Although it is an usual asymptomatic infection, the toxoplasmosis can manifest as a potentially serious disease in immunocompromised individuals and when acquired during pregnancy. The treatment of toxoplasmosis during pregnancy when the fetal infection is confirmed is based in the association of pyrimethamine, sulfadiazine and folinic acid (PSA). Pyrimethamine is potentially toxic and should not be used in the first trimester of pregnancy. The azalide antibiotic azithromycin presents efficacy in a wide range of bacterial infections and antimalarial activity, and it is considered safe for use during pregnancy. The objective of the present study was to evaluate the efficacy of azithromycin in controlling *T. gondii* infection in human placentas from third trimester. The placental villi were infected or not with tachyzoites of *T. gondii* and treated with various concentrations of azithromycin or PSA. The villous placenta were processed for morphological analysis, *T. gondii* intracellular proliferation and immunohistochemistry; and supernatants were evaluated for measuring the activity of LDH, cytokine, hormone production and nitrite. In non-cytotoxic doses (200 and 1000 ug/ml), treatment with azithromycin or PSA did not alter the morphology of the placental villi. Both antibiotics were able to reduce significantly the *T. gondii* intracellular proliferation, and the treatment with PSA promoted increase of IL-12 and IL-10 reduce, whereas azithromycin induced an increase in IL-2 and IL-6 in the groups infected with *T. gondii*, and reduced production of estradiol, progesterone and hCG. Moreover, the previous treatment of *T. gondii* with antibiotics was able to control the replication of the parasite, showing direct action of drugs on *T. gondii*. Thus, our data suggest that azithromycin, as PSA, was able to control the infection with *T. gondii* in an experimental model of human placental explants of third trimester. Additionally our data suggest that azithromycin may be an alternative selection for treatment of congenital toxoplasmosis, expanding the therapeutic strategies to control the parasite in maternal fetal interface.

Keywords: azithromycin, human placental villi, trophoblast, cytokines, sex hormones, *Toxoplasma gondii*.

INTRODUÇÃO

1. *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é uma zoonose cosmopolita, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, um coccídio intracelular obrigatório, membro do filo Apicomplexa, e importante patógeno oportunista para uma vasta gama de hospedeiros, incluindo a espécie humana. Sua prevalência pode variar de região para região, conforme hábitos socioculturais, fatores geográficos e climáticos (Rorman et al., 2006; Da Silva, Langoni, 2009).

O ciclo de vida de *T. gondii* é constituído de fase sexuada e assexuada, sendo que a fase sexuada acontece no intestino dos felídeos (hospedeiro definitivo) onde ocorre a produção de oocistos que são eliminados nas fezes e tornam-se infectivos após esporulação no ambiente, ao serem ingeridos por mamíferos (hospedeiro intermediário) (Munoz et al., 2011). A fase assexuada ocorre tanto nos hospedeiros intermediários quanto no definitivo.

Morfologicamente, *T. gondii* se assemelha às demais células eucariontes. Há presença de um núcleo, mitocôndrias, complexo de Golgi, lisossomos, retículo endoplasmático e um plastídeo, o apicoplasto. Originado por endossimbiose a partir de cianobactérias, o apicoplasto, não possui pigmentos fotossintéticos, mas é claramente indispensável à célula (DeRocher et al., 2012). Estudos *in vitro* demonstraram que o apicoplasto, da mesma maneira que a mitocôndria, possui DNA, sendo essencial para a viabilidade do parasito, bem como para o estabelecimento do vacúolo parasitóforo na nova célula hospedeira, ou seja, os taquizoítas são capazes de invadir, mas não se multiplicam, o que determinará posteriormente a morte do parasito. (Ferguson et al.,

2005). Deste modo o apicoplasto torna-se um alvo preferencial da quimioterapia, pois interfere nos processos de replicação de DNA, transcrição, tradução, modificação pós-traducional, catabolismo e anabolismo específicos do parasito (Lee et al., 2011).

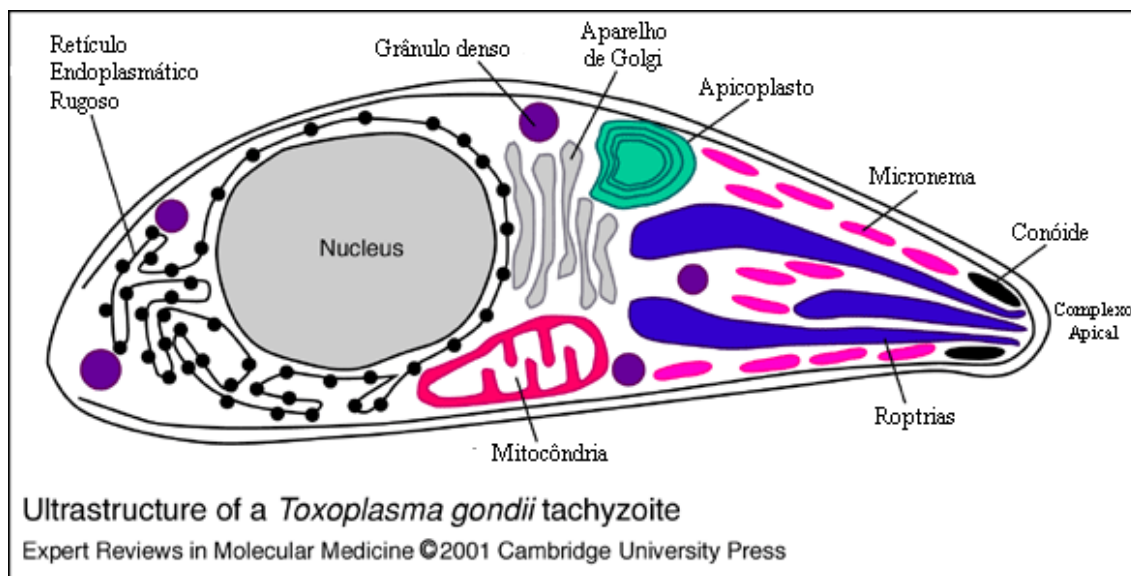


Figura 1. Ultraestrutura de um taquizoíta *Toxoplasma gondii*. O conóide define a extremidade apical do parasito e é associado com a penetração da célula hospedeira. Micronemas, roptrias e grânulos densos são as principais organelas secretoras, encontradas predominantemente na extremidade apical do parasito. O apicoplasto é um plástido com quatro membranas contendo uma fita DNA circular de 35 Kd. *T. gondii* tem apenas um único núcleo e mitocôndria (modificado de Ajioka et al., 2001).

Além de organelas típicas de organismos eucariontes, *T. gondii* apresenta ainda organelas características de organismos pertencentes ao filo Apicomplexa, especialmente aquelas envolvidas com os processos de adesão e invasão do parasito à célula hospedeira: micronemas, roptrias e grânulos densos (Blader; Saeij, 2009). Os taquizoítas são alongados, com as extremidades arqueadas, lembrando o formato de uma banana. Algumas vezes, apresenta-se oval, indicando o início de um processo de divisão celular (Figura 1) (Remington et al., 2001).

2. Imunidade contra o *Toxoplasma gondii*

O sucesso da infecção por *T. gondii* é dependente de um delicado balanço entre a resposta imunológica do hospedeiro, que tenta eliminar o parasito, e as estratégias de evasão ou imunomodulação desempenhadas pelo parasito. O equilíbrio entre estas interações propicia a sobrevivência de ambos, parasito e hospedeiro (Denkers, 2010; Blader, Saeij, 2009).

Em decorrência da pressão do sistema imune os parasitos formam cistos teciduais, contendo a forma de replicação lenta de *T. gondii*, os bradizoítas. Estes cistos se formam principalmente em tecidos musculares e cerebrais dos hospedeiros intermediários (Dubey, 1986, Elmore et al., 2010). Os bradizoítas podem ser liberados a partir dos cistos e transformam de novo em taquizoítas o que causa reativação da doença principalmente em pacientes imunocomprometidos (Munoz et al., 2011).

Toxoplasma gondii é promíscuo e pode infectar virtualmente qualquer célula nucleada do hospedeiro. Assim, a imunidade mediada por células é considerada a mais relevante no mecanismo de regulação da infecção, por ser o *T. gondii* um parasito intracelular obrigatório. A fase assintomática da infecção ocorre durante a indução de uma rápida resposta imune mediada por células, que estimula a produção de níveis elevados de interferon (IFN)- γ , por células natural killer (NK), células T CD4⁺ e células T CD8⁺, durante a fase aguda e fase crônica da infecção (Sanecka, Frickel, 2012). Linfócitos T, células apresentadoras de antígenos (APC), como os macrófagos, e as células NK fazem parte do rol de células que podem favorecer de forma involuntária a disseminação do parasito (Tenter et al.; 2000; Dupont et al., 2012; Sanecka, Frickel, 2012).

As citocinas são proteínas que modulam a resposta imune desempenhando funções autócrinas, parácrinas e endócrinas (Dupont et al., 2012). Funcionam como potentes mediadores de crescimento celular e regulam reações imunológicas e inflamatórias. Atuam como mediadores solúveis do sistema imune e exercem seu papel funcional através de um sistema de comunicação celular entre células linfóides e não linfóides (Luppi, 2003; Dupont et al., 2012). Os macrófagos, quando ativados, produzem óxido nítrico (NO) e intermediários reativos de oxigênio (ROI). Estas substâncias, atuando conjuntamente como o processo de apresentação aos linfócitos, têm ação tóxica contra o parasito (Dunay, Sibley, 2010). Macrófagos, na presença de *T. gondii*, produzem interleucina (IL)-12, que estimula as células NK e as células T CD4⁺ que, por sua vez, diferenciam-se na sub-população Th1, produtora de IL-2 e IFN- γ . Este efeito é muito importante na sobrevivência do hospedeiro. A IL-12 induz a produção IFN- γ pelos linfócitos e é sintetizada principalmente por células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e monócitos (Miller et al., 2009). A produção de IL-12 é induzida pela interação de moléculas de superfície do parasito com receptores da membrana da célula hospedeira tais como receptores do tipo Toll (TLRs) que ativam vias de sinalização intracelulares levando a produção de mediadores pró-inflamatórios (Lang et al., 2002, Aliberti, 2005; Denkers, 2010).

No início da fase aguda da infecção, a síntese de IFN- γ derivado de células NK é desencadeada pela produção de IL-12, contribuindo com a proteção contra a infecção (Sanecka, Frickel, 2012). A produção de IFN- γ é necessária para o controle do parasito tanto da fase aguda quanto da fase crônica da toxoplasmose (Aliberti, 2005). IFN- γ promove a conversão de taquizoítas, estágio de replicação rápida, característicos da fase aguda da infecção, em bradizoítas, estágio de replicação lenta, típicos da fase crônica, constituindo o fenômeno da interconversão (Bohne et al., 1993; Yano et al., 2002).

Além disso, IFN- γ ativa macrófagos que juntamente com as células dendríticas (DC) formam a primeira linha de defesa contra *T. gondii*, limitando a proliferação do protozoário (Stafford et al., 2002, Yap et al., 2007). IFN- γ controla também outros mecanismos efetores contra *T. gondii* como: privação de ferro ou triptofano (Silva et al., 2002) e ativação de algumas enzimas da família de guanósídeo trifosfato (GTPases) P47 (Collazo et al., 2001; Butcher et al., 2005). A privação de ferro mediada por IFN- γ é responsável por inibir a replicação de *T. gondii* dentro de enterócitos (Silva et al., 2002). IFN- γ também é crucial na indução da expressão de indoleamina (2,3)-dioxigenase (IDO). A função desta enzima é degradar o triptofano, um aminoácido essencial para crescimento e replicação de *T. gondii* (Schmidt et al., 2012). Além disso, IFN- γ exerce atividade na imunidade inata por induzir a síntese de uma série de proteínas de 47 kDa que possuem atividade GTPases. Os mecanismos de ação destas GTPases são ainda pouco conhecidos. Acredita-se que causem vesiculação e destruição do vacúolo parasitóforo deixando o parasito exposto ao citosol da célula hospedeira, sendo posteriormente lisado (Collazo et al., 2001; Butcher et al., 2005, Zhao et al., 2009; Fleckenstein et al., 2012).

Outras citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF)- α e IL-6 têm efeito sinérgico com IFN- γ na indução e adequação da resposta imune contra *T. gondii* (Lang et al., 2007; Körner et al., 2010).

Eventualmente, citocinas anti-inflamatórias tais como IL-10, fator transformador de crescimento (TGF)- β e IL-27 regulam a resposta inflamatória, minimizando os danos causados pela inflamação. *Toxoplasma gondii* aparentemente possui a capacidade de determinar seu próprio destino através da maximização de sua resistência e minimizando a resposta imune do hospedeiro. Torna-se cada vez mais claro que as várias cepas de *T. gondii* provocam diferentes respostas imunes inatas, sendo que cepas

altamente virulentas não conseguem estabelecer infecção crônica, não formando cistos, matando o hospedeiro prematuramente devido à hiperinflamação ou alta carga parasitária, dependendo da linhagem do camundongo (Coutinho et al., 2012).

Macrófagos produzem IL-12, apresentam antígenos do parasito às células T por meio de moléculas do MHC de classe II. Macrófagos e células dendríticas são fundamentais para promover resposta imunológica adaptativa assim como apresentam mecanismos microbicidas efetores, tais como degradação fagossomal, produção de NO e ROI (Butcher, Denkers, 2002; Dunay, Sibley, 2010).

3. Toxoplasmose na gestação

O equilíbrio da relação patógeno-hospedeiro é estabelecido pela interação do sistema imune, que tenta eliminar o parasito, com as estratégias de evasão de *T. gondii*. Este protozoário é capaz de manipular a hierarquia funcional das cascatas de sinalização intracelular do hospedeiro, bem como formar cistos teciduais, evadindo assim de uma resposta inflamatória excessiva (Denkers et al., 2004). De maneira geral, ausência de manifestações clínicas caracteriza a interação entre *T. gondii* e hospedeiro humano (Dupont et al., 2012).

A toxoplasmose congênita é caracterizada pela passagem transplacentária de formas taquizoítas de *T. gondii* da mãe para o feto, durante a fase aguda de infecção materna, ou raramente, durante a fase crônica da infecção, após fenômeno de interconversão bradizoíto-taquizoíto (Coutinho et al., 2012). Taquizoítas alcançam a circulação e os tecidos fetais, o que determina a passagem vertical do parasito (Kodjikian, 2010). A infecção primária durante a gestação pode causar lesões inflamatórias que levam a danos neurológicos permanentes, com ou sem hidrocefalia,

coriorretinite e deficiência visual. O risco de transmissão congênita é elevado em mães infectadas durante o terceiro trimestre (60 a 90%); intermediário em mães infectadas no segundo trimestre e baixa em gestantes infectadas no primeiro (10-20%). Em contraste, o risco de aborto é alto em pessoas infectadas durante o primeiro trimestre e baixa em mães infectadas no terceiro trimestres de gestação. Manifestações da doença são geralmente mais graves em fetos infectados no início da gestação (Montoya, Remington, 2008)

O risco de toxoplasmose congênita está na dependência de uma gama de fatores, incluindo o estado imunológico da mãe, o número e virulência do parasito e o tempo de gestação em que a infecção ocorreu (Menzies et al., 2008). Além disso, a via de transmissão, condições climáticas, comportamentos culturais e higiênicos, bem como hábitos alimentares também devem ser considerados (Rorman et al., 2006). A incidência mundial da toxoplasmose congênita é de 1 a 6 a cada 1000 nascimentos (Dupont et al., 2012). Segundo Remington e colaboradores (2001), a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em mulheres grávidas é de 45% na África Central, 51% na Argentina, 54,8% na Austrália, 63% no Chile e 78% na Bélgica. Elsheikha (2008) mostrou que a soroprevalência em gestantes é de 30,1% na Turquia, 57% na Índia Ocidental e 93,2% na Alemanha. Uma pesquisa realizada em Uberlândia, estado de Minas Gerais, mostrou soroprevalência de toxoplasmose em gestantes de 51% e incidência de toxoplasmose congênita de 4,9 a cada 1000 nascimentos (Silva-Segundo, 2002), demonstrando a importância de um programa de triagem e tratamento da toxoplasmose congênita.

A maioria das mulheres grávidas, com infecção aguda adquirida, são assintomáticas, sendo que uma minoria pode apresentar mialgia, febre baixa e linfadenopatia (Montoya, Remington, 2008).

Além da infecção toxoplásmica primária, pode ocorrer transmissão transplacentária do parasito por reativação da doença materna crônica causada por alguma disfunção imunológica. A transmissão vertical de *T. gondii* é possível em mulheres cronicamente infectadas em estado de imunodepressão (pacientes com AIDS ou sob terapia imunossupressora). Entretanto, um interessante caso reportado em 2003 mostrou a transmissão vertical da doença a partir de uma grávida imunocompetente cronicamente infectada, que apresentava uma “cicatriz toxoplásmica” na retina e positiva para testes de anticorpos imunoglobulina (Ig) G específicos para *T. gondii*. O recém-nascido apresentou positividade para ambos os anticorpos IgG e IgM específicos a *T. gondii* e, além disso, foi verificada uma cicatriz macular na retina, sinal típico de toxoplasmose, e aparente calcificação cerebral (Silveira et al., 2003).

A toxoplasmose está associada a vários defeitos congênitos em fetos humanos, especialmente quando a primeira infecção materna ocorre no primeiro trimestre gestacional (Lopes et al., 2009). As manifestações clínicas da toxoplasmose congênita são numerosas, incluindo calcificações intracranianas, convulsões, retardo psicomotor, estrabismo, coriorretinite, microcefalia e hidrocefalia observadas na infância ou mais tardiamente. Calcificação intracraniana, hidrocefalia e coriorretinite formam a “clássica tríade” que serve de base para o diagnóstico da doença. No entanto, esses sinais também podem estar presentes quando da infecção por outros patógenos intracelulares, como citomegalovírus, vírus herpes, vírus da rubéola e *Treponema pallidum* (Montoya, Liesenfeld, 2004). Quando se adiciona o quadro de retardamento mental aos três sinais clínicos descritos acima, compõem-se a “tétrade de Sabin”, que é um leme orientador para o diagnóstico da toxoplasmose congênita (Higa et al., 2010). No entanto, a maioria dos recém-nascidos com toxoplasmose congênita são assintomáticos ou com apresentação subclínica da doença ao nascimento (Mozzatto, Procianoy, 2003;

Montoya, Remington, 2008). Aproximadamente 80% das crianças afetadas pela transmissão vertical do parasito desenvolvem problemas visuais ou de aprendizagem na vida adulta (Kodjikian, 2010).

Testes sorológicos, especialmente os imunoenzimáticos, são exames de rotina para o diagnóstico da doença. A detecção de anticorpos IgM, IgA e/ou IgE específicos a *T. gondii* em sangue de cordão umbilical ou de recém-nascidos, também é utilizada para estabelecer o diagnóstico da doença. Além disso, é possível detectar o parasito em fluidos corporais por isolamento em cultura de tecidos ou por inoculação em camundongos. Pode-se utilizar ainda a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do DNA genômico do parasito (Noordin, 2010).

Programas de educação e saúde pública para a prevenção da toxoplasmose recomendam à população que evitem contato com materiais potencialmente contaminados com o *T. gondii*, como carnes, frutas e verduras. Quando ocorre a forma congênita, além dos programas de educação e saúde pública, a prevenção consiste em tentar evitar a passagem vertical do parasito por meio de administração de quimioterápicos para gestantes em que se evidenciou infecção aguda e realizar diagnóstico precoce, que permita a introdução de esquemas terapêuticos para prevenir ou minimizar os riscos de sequelas futuras para os recém-nascidos (Remington et al., 2001; Elsheika, 2008).

4. A imunologia da gestação

A interface materno-fetal desempenha um papel crítico na defesa contra agentes infecciosos, de modo a manter gravidez normal. Neste microambiente ocorre produção de uma grande variedade de citocinas e hormônios que podem iniciar e regular as

respostas inflamatórias (Uchide et al., 2012). O feto é considerado um semienxerto, uma vez que expressa antígenos de origem paterna e materna. Os aloantígenos fetais são codificados por genes polimórficos herdados do pai, que podem provocar respostas imunes maternas que levariam à rejeição fetal logo depois da implantação do blastocisto na parede uterina, mas geralmente isso não ocorre (Zenclussen, 2006, Rango, 2008). A aceitação do feto é o resultado de uma resposta imune materna modulada permitindo o desenvolvimento de uma gravidez bem sucedida (Adams et al., 2007).

A interface materno-embrionária é representada pela placenta, um órgão especializado que fornece suporte ao crescimento e desenvolvimento normal do feto. A implantação e formação da placenta são processos altamente coordenados envolvendo a interação entre células trofoblásticas e a mucosa uterina, caracterizando o início do relacionamento materno-embrionário (Cardaropoli et al., 2012). A placenta possui inúmeras funções dentre as quais podemos citar o transporte de oxigênio, água, carboidratos, aminoácidos, vitaminas, minerais e outros nutrientes para o feto; exerce atividade endócrina, além de proteger o feto contra moléculas antigênicas, infecções e doenças maternas (Oreshkova et al., 2012).

O sucesso da implantação e manutenção da gestação depende de uma comunicação apropriada entre blastocisto e endométrio e de um útero adequadamente preparado pela ação hormonal, principalmente do hormônio progesterona, bem como de uma equilibrada interação entre citocinas (Cardaropoli et al., 2012).

Células Th1 são caracterizadas por apresentarem reações mediadas por células, sendo conhecidas como pró-inflamatórias, secretando IFN- γ , TNF- α e TNF- β e IL-2. Células Th2 secretam citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, favorecendo a produção de anticorpos (Dupont et al., 2012).

Células Th1 e Th2 são mutuamente inibitórias, assim, IL-10, um produto das células Th2, inibe o desenvolvimento das células Th1, enquanto IFN γ , um produto das células Th1, previne a ativação das células Th2 (Dupont et al., 2012). Evidentemente, é o balanço entre estas citocinas que define um perfil pró ou anti-inflamatório.

O estabelecimento da gravidez é dependente do balanço de citocinas de perfis Th1 / Th2, com predominância do tipo Th2, sendo este o mecanismo mais relevante na manutenção e sucesso gestacional (Wilczynski et al., 2008, Dupont, 2012).

A produção de citocinas anti-inflamatórias parece ser fundamental para o sucesso da gestação (Dealtry et al., 2000). Durante a gestação ocorre uma modulação do sistema imune e isto resulta em uma tolerância imunológica a um feto alográfico (Cutolo et al., 1998). Esta tolerância se manifesta por um decréscimo na produção de IFN- γ e a um padrão de produção de citocinas de perfil Th2 sob estreito controle de secreção hormonal e de citocinas pela placenta (Dupont et al., 2012).

Durante a gestação, as funções fisiológicas maternas são alteradas e o sistema imune normalmente apresenta um estado de tolerância aos antígenos fetais (Denney et al., 2010). Muitos hormônios, principalmente estrógeno e progesterona, estão aumentados e esta condição gera alterações no balanço de citocinas de perfil Th1/Th2 (Robinson, Klein, 2012). Há uma super expressão de citocinas tipo Th2, o que pode causar a maior susceptibilidade ao parasito, e, conseqüentemente, à infecção placentária e fetal (Abou-Bacar et al., 2004). No entanto, quando ocorre infecção, pode haver uma maior expressão de citocinas tipo Th1 devido à carga parasitária e virulência da cepa, o que pode ser prejudicial ao feto, muitas vezes acarretando aborto. Assim, a existências destas duas situações (gestação/infecção) impõem ao organismo materno adaptações que devem convergir para um padrão de resposta que leve em conta a existência de uma gestação saudável e a severidade da infecção fetal (Menzies et al., 2012).

A complexa rede de sinalização por meio de citocinas na interface materno-fetal adquire papel crucial durante infecções parasitárias. Qualquer desequilíbrio do balanço imunológico pode potencializar a produção de citocinas pró-inflamatórias de perfil Th1, como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ e IL-2 que são prejudiciais ao feto, podendo levar ao aborto (Daher et al., 2004; Menzies et al., 2012). Uma vez que o sistema imunológico materno produz citocinas anti-inflamatórias para evitar a rejeição ao feto, há um potencial aumento da susceptibilidade a infecções parasitárias (Robbins et al., 2012). A maior susceptibilidade de gestantes à infecção por *T.gondii*, pode estar relacionada à maior produção de citocinas anti-inflamatórias, que são expressas de forma significativa durante a gestação. Neste caso, observa-se uma situação de “imunossupressão”, pois hormônios como estrógeno e progesterona modulam a reatividade das células T e a produção de citocinas (Vargas-Villavicencio et al., 2009; Robinson, Klein, 2012).

Em camundongos, a ativação de macrófagos por $\text{IFN-}\gamma$, em presença de coestimuladores, como LPS ou $\text{TNF-}\alpha$, é necessária para ativar a atividade citotóxica de macrófagos contra *T. gondii* (Menzies et al., 2012). O papel funcional de $\text{IFN-}\gamma$ na interface materno-embriônica é intrigante. Quando camundongos infectados por *T. gondii* recebem $\text{IFN-}\gamma$ se observa uma proteção significativa exercida por esta citocina (McCabe; Luft; Remington, 1984); entretanto, quando se neutraliza $\text{IFN-}\gamma$ em Balb/c em fase aguda da toxoplasmose, observa-se uma diminuição na infecção placentária e fetal de tais animais (Abou-Bacar et al., 2004). Além disto, linhagem de células trofoblásticas humana (BeWo) são incapazes de controlar a infecção por *T. gondii*, mesmo quando tratadas com $\text{IFN-}\gamma$ (Oliveira et al., 2006; Barbosa et al., 2008), apesar do $\text{IFN-}\gamma$ promover a adesão de monócitos, principal via de disseminação de *T. gondii*, em células BeWo (Pfaff et al., 2008; Dunay, Sibley, 2010).

O estabelecimento da cinética entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias pode contribuir para a interpretação das funções de citocinas de perfil Th1 e Th2 na interface materno-embrionária que garantam o sucesso de uma gestação, mesmo sob uma situação de infecção por parasito intracelular, como *T. gondii*.

5. Regulação hormonal da gestação

Outros fatores também são importantes para o sucesso da gestação como a produção de hormônios, já que atuam como coadjuvantes na diferenciação de células T ou favorecendo modificações para a produção de citocinas do tipo Th2. Estradiol ocorre em altas concentrações em mulheres gestantes sendo que seus receptores são expressos em vários tecidos linfóides, além de células como linfócitos, macrófagos e células dendríticas (Robinson et al. 2012). Estradiol afeta os diversos aspectos da imunidade inata, incluindo a inibição da atividade funcional de células que influenciam as respostas imunes adaptativas, como mastócitos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas e células NK (Entrican, 2002; Mendelson, 2009). O estradiol aumenta a secreção de IL-10 e IFN- γ por clones ativados de células T antígeno-estimuladas. A adição de altas concentrações de estradiol à cultura favorece a produção de IL-10 e, em baixas concentrações, IFN- γ (Entrican, 2002; Mendelson, 2009).

A progesterona é produzida pelo corpo lúteo no ovário e também pela placenta durante a gravidez, e com papel anti-inflamatório (Robinson et al., 2012). A gonadotrofina coriônica humana (hCG), um hormônio glicoprotéico, o único exclusivo da gestação, é produzido algumas horas após a fecundação pelas células embrionárias e apresenta capacidade para regular negativamente a imunidade celular materna contra antígenos paternos, por ser um fator de atração para células Treg, induzindo, assim, uma

condição de imunotolerância (Schumacher et al., 2009; Tsampalas et al., 2010). Apresenta também atividade angiogênica, sendo que o comprometimento desta função pode levar a placentação insuficiente e aumento do risco de pré-eclâmpsia (Tsampalas et al., 2010).

As alterações hormonais e imunológicas que ocorrem ao longo da gestação são necessárias para suportar uma gravidez saudável, mas também afetam drasticamente a suscetibilidade feminina às doenças auto-imunes e doenças infecciosas (Fig. 2). Apesar de existirem muitos estudos sobre estas doenças, relatando a importância dos fatores imunológicos ao longo da gravidez, poucos estudos consideram o papel que os hormônios desempenham na orquestração dessas alterações imunológicas (Robinson, Klein, 2012).

As concentrações de hormônios esteróides, são consideravelmente mais elevadas durante a gravidez do que durante outras fases do ciclo reprodutor feminino e aumenta ao longo do curso da gravidez, com níveis mais altos alcançados durante o terceiro trimestre gestacional (Robinson, Klein, 2012). A atividade dos esteróides sexuais por meio de sinalização por receptores intracelulares de esteróides suprime a regulação da transcrição de citocinas inflamatórias. A supressão hormonal de IFN- γ , que possui propriedades antivirais e antiparasitárias, prejudica significativamente a evolução de doenças infecciosas e favorece o desenvolvimento de doenças inflamatórias autoimunes durante a gravidez (Abou-Bacar et al., 2004)

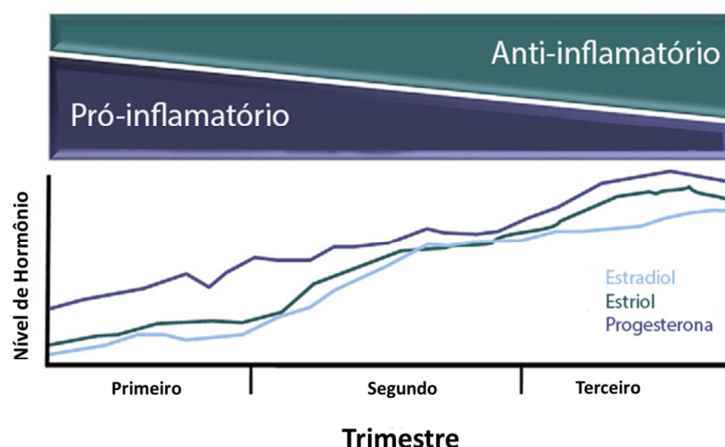


Fig. 2: Durante os três trimestres da gravidez, há uma mudança no equilíbrio de respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Até o terceiro trimestre, respostas anti-inflamatórias, incluindo a atividade dos macrófagos M2, células Th2, e células T reguladoras, são elevadas. Atividade inflamatória de células NK, macrófagos M1 e células Th1 são reduzidas. Neste período, as alterações nas concentrações de esteróides sexuais, incluindo o estriol, estradiol, progesterona, podem levar a mudanças imunológicas durante a gravidez (modificado de Robson, Klein, 2012).

Existem evidências consideráveis de que os hormônios esteróides afetam o curso da toxoplasmose em humanos e camundongos. Henry e Beverley (1976) foram os primeiros a demonstrar diferenças nas respostas imunes e inflamatórias de camundongos machos e fêmeas, após a infecção com *T. gondii*. Nestes estudos, camundongos fêmeas desenvolveram inflamação cerebral mais grave do que machos. Em camundongos fêmeas, o estradiol agrava, enquanto a gonadectomia reduz a carga parasitária e a patogênese da doença (Kittas, Henry, 1980). De maneira simultânea, a gonadectomia e tratamento com estrógeno predispueram cobaias a aumento de cargas parasitárias quando comparados com animais controle não tratados (Kittas, Henry, 1979). Altas concentrações de progesterona também aumenta a susceptibilidade a *T. gondii* durante a gravidez pela supressão de IL-12 e IFN- γ (Jones et al., 2010). É importante ressaltar que mulheres grávidas não são imunodeprimidas, mas suas respostas imunes estão inclinadas para um fenótipo anti-inflamatório que influencia não apenas o resultado de gravidez, mas a patogênese de diversas doenças incluindo a toxoplasmose.

6. Tratamento da toxoplasmose congênita

Os tratamentos convencionais existentes para a toxoplasmose congênita não podem ser considerados totalmente eficazes, uma vez que os medicamentos disponíveis são parcialmente eficientes no tratamento de infecções agudas e pouco ou nada eficientes na fase crônica da doença (Grujic et al., 2005; Chêne, Thiébaud, 2009; Martins-Duarte et al., 2010).

Uma droga ideal para o tratamento da toxoplasmose deveria mostrar efetiva capacidade de penetrar e se concentrar na placenta, atravessar a barreira placentária e ter atividade parasiticida contra diferentes formas de *T. gondii*, além de não apresentar efeito citotóxico e teratogênico (Derouin, 2001, Barbosa et al., 2012). Infelizmente nenhuma das drogas utilizadas para o tratamento da toxoplasmose atinge este padrão (Chêne, Thiébaud, 2009). Entretanto, muitos dos fármacos administrados às grávidas têm a capacidade de transpor a placenta, expondo o embrião em desenvolvimento a seus efeitos farmacológicos e/ou teratogênicos.

Gestantes com até 18 semanas de gestação e com sorologia positiva para *T. gondii*, apresentando IgM positivo e IgG de baixa avidéz são indicativos de uma infecção recente. Na tentativa de prevenir a infecção fetal recomenda-se o início imediato do tratamento (Chêne, Thiébaud, 2009).

O uso do macrolídeo espiramicina é capaz de reduzir a incidência da toxoplasmose congênita em 60%, sendo inicialmente o tratamento de escolha (Montoya, Remington, 2008). Entretanto, apesar da espiramicina ser apta a eliminar as formas taquizoítas do parasito, não é capaz de cruzar a barreira placentária, sendo, portanto inadequada para o tratamento da infecção fetal (Grujic et al., 2005). Todavia, por ser

capaz de retardar a transmissão do parasito, promove redução na severidade da infecção fetal (Remington et al., 2001). Seu uso é indicado para gestantes primo-infectadas, mas sem a confirmação de infecção fetal, não alterando a patologia da infecção fetal. Caso a infecção seja confirmada por PCR do líquido amniótico, a partir de 18 semanas de gestação, recomenda-se o tratamento com a combinação de pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico (PSA) (Montoya, Remington, 2008). Essa associação tem o potencial de reduzir a transmissão congênita em até 30% (Meneceur et al., 2008). Porém, a capacidade do tratamento em reduzir possíveis sequelas está relacionado com o tempo de gestação e de soroconversão da gestante. Estudos demonstram que a terapêutica pode não reduzir o risco de sequelas neurológicas graves, sendo que o tratamento pré-natal deverá ser administrado em até 4 semanas após a infecção materna, para reduzir a chance de lesões intracranianas (Gras et al, 2005; Cortina-Borja et al, 2010)

De maneira semelhante ao observado na espécie humana, esta associação de fármacos tem eficiência limitada contra a transmissão vertical de *T. gondii* em *Calomys callosus*, modelo experimental da toxoplasmose congênita (Costa et al. 2009).

Remington e colaboradores (2001) elaboraram um guia para tratamento da infecção por *T. gondii* em mulheres gestantes em diferentes estágios da infecção, bem como indicação de tratamento para toxoplasmose congênita (Quadro 1).

Diante da potencial gravidade das manifestações da toxoplasmose e consequentes defeitos congênitos, necessário se faz a busca de fármacos. Entretanto, igualmente preocupantes são os possíveis efeitos colaterais ocasionados pelas drogas tanto para a gestante quanto para o feto, particularmente a pirimetamina pelo seu potente efeito teratogênico (Braz et al., 1999).

Uma droga em estudo para o tratamento da toxoplasmose congênita, testada inicialmente em murinos, é a azitromicina, a qual apresenta atividade inibitória

prolongada sobre a replicação intracelular de taquizoítas (Montoya; Liesenfeld, 2004; Torkildsen et al., 2008).

Período Gestacional	Tratamento
1º Trimestre (1º a 18º semanas)	Espiramicina (Rovamicina® comp. 500 mg) Dose: 3,0g/dia 02 comp. de 8/8 horas - V.O. (em jejum)
Após a 18º semana (até o parto): esquema tríplice	Pirimetamina (Daraprin® comp. 25 mg) Dose de ataque: 100 mg/dia (2 ^{os} dias) 02 comp. de 12/12 horas - V.O. Dose de manutenção: 50 mg/dia 02 comp. em dose única diária - V.O.
	Sulfadiazina (Sulfadiazina® comp. 500 mg) Dose: 75 mg/Kg/dia (máximo de 4,0g/dia) 02 comp. de 6/6 horas - V.O.
	Ácido Folínico (Leucovorin® ou manipulado) Dose: 15 mg - 01 comp. ao dia - V.O.

Quadro 1: Guia para o tratamento da infecção por *T. gondii* em mulheres gestantes e em infecção congênita de acordo com Remington e colaboradores (2001)

Na sequência, as características gerais dos fármacos utilizados neste estudo para o tratamento da toxoplasmose congênita:

6.1. Pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico

A pirimetamina é um inibidor seletivo da síntese do ácido fólico em taquizoítas de *T. gondii*. Esta droga só é realmente efetiva em combinação com outras drogas devido a sua concentração no soro ser altamente variável entre diferentes indivíduos. Atua como inibidor da biossíntese dos ácidos nucleicos, entretanto, é pouco empregado

na terapêutica por ser altamente tóxico, pois interage indistintamente com os processos bioquímicos tanto do parasito quanto do hospedeiro. Apresenta efeitos tóxicos comuns a drogas antifolato sobre a medula óssea, sendo necessária a adição de ácido folínico à terapêutica do paciente para prevenir a trombocitopenia, anemia megaloblástica e leucopenia dentre outros (Chêne, Thiébaud, 2009, Franco et al., 2011). A pirimetamina é teratogênica não devendo ser indicada durante os primeiros meses de gestação (Braz et al., 1999). A pirimetamina atua inibindo as enzimas diidrofolato-redutases (DHFRs) que convertem o ácido diidrofolico em ácido tetraidrofolico, um processo que leva à síntese de purinas e, por fim, de DNA. A pirimetamina quando administrada juntamente com as sulfonamidas, produz bloqueio sequencial dessa etapa metabólica, resultando em aumento acentuado (sinergismo) da atividade de ambos os fármacos (Katzung, 2006).

As sulfanamidas como sulfadiazina, sulfametoxazol e sulfadoxina têm atividade parasitostática por inibir a síntese de folatos. São distribuídas por todos os tecidos e líquidos do organismo, sendo que as sulfonamidas disponíveis atualmente são derivadas da sulfanilamida contendo núcleos heterocíclicos. Entretanto só são efetivas contra taquizoítas de *T. gondii*. A atividade farmacodinâmica deste medicamento se deve ao fato de serem análogos estruturais do ácido p-aminobenzóico (PABA). Através da inibição competitiva, as sulfonamidas impedem a incorporação do PABA durante a biossíntese do ácido diidropteróico, funcionando dessa forma como antimetabólito. A aplicação clínica desse antimetabólito fundamenta-se em sua toxicidade seletiva sendo mais tóxico para o microorganismo que para o homem (Bosch-Driessen et al., 2002).

O efeito teratogênico da pirimetamina pode ser minimizado através da administração de ácido fólico a gestantes agudamente infectadas (Remington et al., 2001; Bosch-driessen et al., 2002;). O ácido fólico, também conhecido como folacina ou ácido pteroil-glutâmico, é encontrado em vários alimentos. É uma vitamina

hidrossolúvel pertencente ao complexo B, necessária para a formação de proteínas estruturais e hemoglobina (Vijayalaxmi et al., 2000). Apresenta-se como um pó cristalino amarelo pouco solúvel em água e facilmente absorvido pela mucosa duodenal. Após absorção, o ácido transforma-se em coenzimas ativas que se distribuem pelos diferentes órgãos, concentrando-se principalmente no fígado, convertendo-se em ácido folínico, processado através da urina e fezes (Vijayalaxmi et al., 2000).

6.2. A azitromicina

Sintetizada inicialmente em 1980, a azitromicina é um antibiótico da classe do “azalídeos” do grupo dos macrolídeos (Chico, Chandramohan, 2011). O grupo dos macrolídeos são compostos caracterizados por um anel de lactona macrocíclico de amplo espectro que se liga a diferentes açúcares, representado inicialmente pela eritromicina, que são usadas no tratamento de infecções bacterianas e parasitos intracelulares, como *T. gondii* (Remington et al., 2001; Katzung, 2006). A azitromicina diferencia-se da eritromicina em dois aspectos: sua lactona é constituída por 15 membros e contém um átomo de nitrogênio, ao passo que a lactona da eritromicina possui 14 membros, não possuindo o átomo de nitrogênio. Esta pequena diferença é responsável pelas melhores características farmacológicas e microbiológicas da azitromicina: seu espectro de ação é amplo, sua difusão tecidual é mais rápida e elevada, bem como sua meia-vida é mais prolongada do que a de outros macrolídeos. Além disso, pode ser administrada em dose única ao dia, tem maior resistência a degradação ácida no estômago, menores efeitos colaterais e maior amplitude das propriedades terapêuticas (Petrooulos et al., 2009; Salman et al., 2010).

Após a administração oral em humanos, a azitromicina é amplamente distribuída pelo organismo e com pico de concentração plasmática entre 2 a 3 horas, podendo ser administrada a qualquer hora do dia, inclusive com as refeições (Katzung, 2006).

A estrutura da azitromicina confere maior estabilidade em meio ácido, devido à presença de dois tipos básicos de grupos de amina terciária que melhoram as suas propriedades anfipáticas, incrementando suas características farmacocinéticas e atividade contra micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos (Chico & Chandramohan, 2011). A azitromicina atua ligando-se de maneira reversível a subunidade 50S do ribossomo bacteriano, inibindo a síntese de proteínas (Retsma, 2001; Torkildsen et al., 2008; Petropoulos et al., 2009). No caso de microorganismos sensíveis, incluindo *P. falciparum* e *P. vivax*, a ação da azitromicina afeta a formação do parasito por impedir o desenvolvimento de polipeptídeos no apicoplasto (Sidhu et al., 2007; Petropoulos et al., 2009). Duas regiões do ribossomo são críticas para a síntese de proteínas: o centro decodificador na subunidade 30S que garante que apenas os tRNA, portadores de anticódons que se pareiam com o códon (chamados de RNA cognatos), sejam aceitos no sítio A e o centro de peptidil transferase na subunidade 50S, onde os tRNA cognatos se associam para a formação da ligação peptídica. Os macrólídeos atuam inibindo a síntese protéica do parasito pela ligação do fármaco à subunidade maior 50S do ribossomo (Chico et al., 2011). A presença do antibiótico neste local impede a formação dos peptídeos, resultando na inibição da tradução (Brisson-Noël, 1988; Rubinstein; Keller, 1998; Mankin, 2008, Chico et al., 2011).

Em 1997, Fichera e Roos demonstraram que o genoma do apicoplasto de *T. gondii* começa a degradar nos ciclos seguintes ao tratamento com antibiótico. Em outro estudo, a prole de uma cepa transgênica de *T. gondii* com um defeito de segregação do apicoplasto, morria logo após a invasão num segundo ciclo de infecção de células

hospedeira, enquanto os parasitos sem alteração continuavam replicando normalmente (He et al., 2011). Esta observação validou a hipótese de que o apicoplasto é essencial para a viabilidade do parasito e que os antibióticos podem exercer os seus efeitos em *T. gondii* e *P. falciparum*, por bloquear a segregação do apicoplasto (Dahl, Rosenthal, 2008). No entanto, a ação específica de antibióticos na segregação do apicoplasto não foi demonstrada, e a natureza do defeito do apicoplasto causada por antibióticos em *P. falciparum* permanece elusivo.

Sinagra e colaboradores (2007) demonstraram que a azitromicina é capaz de controlar a infecção por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* em hamsters. Adicionalmente, Braz e colaboradores (1999) comprovaram que a associação de azitromicina e pirimetamina apresenta alta eficácia no tratamento da toxoplasmose em camundongos. A azitromicina também inibe o crescimento de taquizoítas de *T. gondii*, através da inibição da síntese protéica do parasito (Lescano et al., 2004). A associação de azitromicina e cloroquina como alternativa ao tratamento da Malária tem evidenciado adequada resposta parasitológica em ensaios clínicos na África (Chico, Chandramohan, 2011).

Os macrolídeos possuem propriedades anti-inflamatórias, o que pode influenciar na resposta imune, principalmente em infecções parasitárias (Rubin, 2004; Friedlander; Albert, 2010). Estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstraram o efeito modulador dos macrolídeos no sistema imunológico exercendo um efeito negativo sobre a resposta pró-inflamatória (Costa et al, 2009; Franco et al., 2011). Recentemente foi demonstrado pelo nosso grupo que a azitromicina tem importante atividade protetora na transmissão vertical de *T. gondii* em modelo experimental animal de toxoplasmose congênita (Costa et al, 2009). Adicionalmente não foram observados efeitos tóxicos para a fêmea gestante submetida ao esquema terapêutico utilizado. Tamaru e colaboradores (2011) utilizaram

a azitromicina para tratamento de um feto com toxoplasmose sintomática severa e descreveram que apesar de muitos sinais e sintomas associados com toxoplasmose congênita persistirem após o nascimento, a remissão clínica de alguns sinais e testes imunológicos subsequentes à utilização da droga podem ser fortemente sugestivos de seu efeito terapêutico da azitromicina sobre o feto. Assim, todos esses resultados sugerem que azitromicina possa ser uma opção terapêutica no tratamento da toxoplasmose congênita.

7. Modelo de estudo com vilos placentários

A placenta é um órgão discoidal que constitui a interface materno-fetal. Durante o desenvolvimento embrionário, no interior da placenta surgem cavidades (espaço intervilloso) com uma vasta rede de expansões, os vilos placentários, os quais são banhados por sangue materno do espaço intervilloso. Nestes espaços nutrientes, gases e resíduos são trocados através da superfície dos vilos, entre o sangue materno e os capilares fetais, encontrados no interior dos vilos. Os vilos placentários são estruturas revestidas por duas camadas de trofoblasto. A camada exterior é composta de um sincício celular multinucleado (sinciciotrofoblasto), enquanto a camada interior é uma camada epitelial polarizada (citotrofoblasto). Encontram-se também células do mesênquima fetal, células endoteliais, sanguíneas e células do sistema imunológico (células de Hofbauer) (Robbins et al., 2012).

Explantos de vilos placentários humanos de primeiro e terceiro trimestres podem ser cultivados *in vitro* sob condições adequadas, por até 12 dias, para estudo do monitoramento da morfologia do tecido, viabilidade, secreção de hormônios placentários e outros fatores, além de mecanismos funcionais da atividade de transporte

através da placenta e apoptose (Vaidya, Walsh, Gerk, 2011). Além disso, os vilos também têm sido aplicados em estudos de infecção *in vitro*, para estudo da transmissão vertical de doenças, tais como *Trypanosoma cruzi* (Luján, et al., 2004), *Plasmodium falciparum* (Lucchi et al., 2008) e *Toxoplasma gondii* (Ferro et al., 2008).

Os mecanismos envolvidos na atividade protetora da azitromicina para a toxoplasmose ainda não foram esclarecidos no microambiente placentário. Desta maneira, este trabalho visa adicionar elementos que auxiliem no entendimento da complexa imunologia da gestação colaborando para o entendimento dos processos que ocorrem em vilos humanos infectados por *T. gondii* e tratados com azitromicina. O entendimento da ação parasiticida e/ou parasitostática, bem como possíveis efeitos citotóxicos para células trofoblásticas e demais células da árvore vilosa, poderá contribuir para a terapêutica da toxoplasmose congênita por adicionar alternativas para o tratamento da toxoplasmose congênita, contribuindo assim para a diminuição da mortalidade e morbidade de recém-nascidos e crianças congenitamente infectados por *T. gondii*.

OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a eficácia de azitromicina no tratamento de vilos placentários humanos infectados experimentalmente por *Toxoplasma gondii* utilizando como modelo de estudo explantes de placentas humanas de terceiro trimestre gestacional.

1. Objetivos específicos

1. Determinar a toxicidade tecidual do tratamento com azitromicina ou da associação pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico (PSA) em cultura de explantes de vilos placentários infectados ou não por *T. gondii*;
2. Determinar a influência de azitromicina ou PSA na proliferação de *T. gondii* em cultura de explantes de vilos placentários;
3. Quantificar a produção de nitrito e citocinas Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α) e Th2 (IL-4 e IL-10) e IL-17A em sobrenadante de cultura de explantes de vilos placentários tratados com azitromicina ou PSA e/ou infectados por *T. gondii*.
4. Quantificar a produção de hormônios (estradiol, progesterona e hCG+ β) em sobrenadante de cultura de explantes de vilos placentários tratados com azitromicina ou PSA e/ou infectados por *T. gondii*.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em seres humanos da Universidade Federal de Uberlândia segundo a Resolução 196/96/CNS tendo sido aprovado sob o protocolo de número 118/09 (Anexo I).

1. Manutenção de células BeWo em cultura para manutenção de *T.*

gondii

Para manutenção de taquizoítas de *T. gondii*, células de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo) foram adquiridas do American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) e mantidas em cultura no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia.

As células foram cultivadas separadamente em frascos de cultura de 25cm² ou 75cm² contendo meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab), 10.000 U/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂, de acordo com Barbosa e colaboradores (2008).

O repique das células foi realizado a cada dois dias e procedeu-se, brevemente, da seguinte maneira: primeiramente, as células foram lavadas com meio sem soro e em seguida incubadas com solução de tripsina mais 0,25% de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (Sigma) durante 5 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Depois, as células foram lavadas e retiradas dos frascos de cultura com uso de meio a 10% de soro,

transferidas para tubos falcon de 15 mL e centrifugadas a 400g por 5 minutos a temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, as células foram homogeneizadas em 1 mL de meio com soro e distribuídas em frascos novos de cultura. O excedente foi congelado em meio de congelamento: 90% de SBF e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma).

2. Manutenção *in vivo* e *in vitro* da cepa RH e do clone RH 2F1 de *T. gondii*

Inicialmente, a cepa RH de *T. gondii* foi mantida *in vivo* na cavidade peritoneal de camundongos Swiss no Centro Bioterismo Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia conforme descrito por Mineo e colaboradores (1980). O repique foi realizado a cada 48 horas e procedeu-se da seguinte maneira: a cavidade peritoneal de camundongos infectados foi lavada com meio de cultura RPMI 1640 sem soro e o exsudato peritoneal contendo taquizoítas foi inoculado em camundongos não infectados para manutenção da cepa *in vivo*.

Os taquizoítas retirados da cavidade peritoneal de camundongos Swiss foram centrifugados a 400g por 5 minutos, contados em câmara de Neubauer e adicionados a alguns frascos de cultura contendo células BeWo com a finalidade de manter parasitos *in vitro* para os futuros procedimentos experimentais. À medida que a grande maioria das células infectadas em cultura encontrava-se lisada pelo parasito, o meio contendo taquizoítas livres foi centrifugado a 400g por 5 minutos, os parasitos homogeneizados em meio a 2% de soro e distribuídos em novos frascos contendo células não infectadas.

Os taquizoítas do clone RH 2F1 de *T. gondii*, derivados da cepa RH, expressam o gene da enzima β -galactosidase e foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Vern B.

Carruthers da Escola de Medicina da Universidade de Michigan, EUA. Os parasitos foram mantidos em células BeWo cultivadas em meio RPMI a 2% de soro. À medida que a maioria das células infectadas em cultura encontrava-se lisadas pelo parasito, o meio contendo taquizoítas livres foi centrifugado a 400g por 5 minutos, os parasitos homogeneizados em meio RPMI1640 a 2% de SBF e distribuídos em novos frascos contendo células não infectadas.

3. Ensaio de invasão e proliferação

Para compararmos a capacidade de invasão e proliferação entre os taquizoítas da cepa RH e o clone RH 2F1 de *T. gondii*, monocamadas de células BeWo foram mantidas em placas de 24 poços sobre lamínulas redondas de 13mm (4×10^5 células/poço/200 μ L) e cultivadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. As células foram lavadas com meio e, em seguida, parasitos das cepas RH e clone RH 2F1 de *T. gondii* foram adicionados separadamente às placas diferentes numa proporção de 5 parasitos por célula (5:1) e mantidos durante 24hs, sempre em triplicata. Posteriormente, as lamínulas foram fixadas em formol 10% em solução salina tamponada com fosfato (PBS), coradas com azul de toluidina durante 30 segundos, montadas em lâminas de microscopia, e analisadas por microscopia de luz para análise dos seguintes parâmetros de infecção: número total de parasitos e número de parasitos por célula a cada 100 células examinadas aleatoriamente.

4. Cultura de explantes de vilos placentários humanos

Pacientes gestantes, sorologicamente negativas para HIV, hepatite B e C, *T. gondii*, sífilis ou outras infecções, atendidas no Setor de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) foram informadas sobre os objetivos do trabalho e após a autorização comprovada pela assinatura do termo de consentimento (Anexo II), tiveram suas placentas coletadas. No total, 22 placentas a termo foram coletadas (36-40 semanas de gestação), provenientes de cesária. As placentas foram então processadas para a dissecação dos vilos. O tecido foi lavado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril e dissecado assepticamente sob microscópio estéreooscópio para remover tecidos endometriais e membranas fetais dentro de até uma hora após a coleta. Vilos flutuantes com cinco a sete extremidades livres foram selecionados como descrito por Caniggia e colaboradores (1997). Os explantes foram transferidos para placas de cultura de 96 poços, cultivados em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 10.000 U/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina e incubados a 37°C em estufa de CO₂. Após 12 hs em cultura, os vilos foram infectados ou não com *T. gondii* (clone RH 2F1) e, após 48 hs, tratados com diferentes concentrações de drogas e mantidos em estufa de CO₂ por mais 24 horas. Os vilos foram coletados para análise morfológica, ensaio de proliferação e imuno-histoquímica e, os sobrenadantes, armazenados a -80°C para dosagens de citocinas, hormonal e de nitrito.

5. Antibióticos

Após a coleta dos vilos placentários e infecção com os parasitos do clone RH 2F1 de *T. gondii* (1×10^6 parasito por poço) por 48 hs, os antibióticos azitromicina (Biofarma, Uberlândia, Brasil), Pirimetamina (Daraprim®- Rhodia Farma, Brasil), Sulfadiazina (Labdiazina® - Novartis Farma, Brasil), e Ácido folínico (Leucovorin®- Interlab Farmacêutica, Brasil) em pó foram reconstituídos em meio de cultura a uma concentração de 5.000 µg/mL (solução estoque) pouco tempo antes dos procedimentos experimentais. A obtenção da solução de trabalho foi feita a partir da solução estoque pela adição do meio de cultura para obtenção das diferentes concentrações.

Para a associação de pirimetamina/sulfadiazina/ácido folínico (PSA), adaptamos a proporção da terapêutica (1: 0,75: 0,15, de pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico respectivamente) preconizada no guia para o tratamento da infecção por *T. gondii* em mulheres gestantes e em infecção congênita de acordo com Remington e colaboradores (2001). Assim, as concentrações utilizadas foram:

Pirimetamina (µg/mL)	Sulfadiazina (µg/mL)	Ácido folínico (µg/mL)
200	150	30
1000	750	150
5000	3750	750

6. Análise da toxicidade tecidual

Explantes placentários foram cultivados em placas de cultura de 96 cavidades. Após 12 horas em cultura, os vilos foram infectados ou não com 1×10^6 taquizoítas de *T. gondii* (clone RH 2F1) e, após 48 horas de infecção foram lavados e tratados com azitromicina nas concentrações de 200, 1000 e 5000 $\mu\text{g/mL}$ ou associação PSA obedecendo ao critério de Remington e colaboradores (2001) como descrito anteriormente, nas concentrações 200/150/30, 1000/750/150 e 5000/3750/750 $\mu\text{g/mL}$ de pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico, respectivamente. Após 24 horas de tratamento, os sobrenadantes foram coletados para determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), que foi aferida usando-se um kit comercial para diagnóstico, segundo as instruções do fabricante (LDH Liquiform, Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil) e expressa em U/mL ou em quantidades relativas de LDH liberada em relação à lise celular total (controle positivo) obtida com Triton X-100 0,2% (% do total). O princípio do teste baseia-se na mensuração da redução de NAD a NADH pela LDH (enzima citosólica, liberada para o meio extracelular quando a integridade da membrana é afetada). Quanto maiores os danos, maior a perda de integridade da membrana, maior o sinal espectrofotométrico. Caso não haja dano à membrana, a LDH permanece intracelularmente, não ocorrendo reação.

7. Ensaio de proliferação com clone RH 2F1 de *T. gondii*

Explantes placentários foram cultivados em placas de cultura de tecidos de 96 cavidades. Após 12 horas em cultura, os vilos foram infectados ou não com 1×10^6 taquizoítas de *T. gondii* (clone RH 2F1). Após 48 horas de infecção, os vilos infectados foram lavados para retirada de parasitos não infectantes e tratados com azitromicina ou associação PSA em concentrações de 200 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Após 24 horas de tratamento, os vilos foram lavados no próprio meio de cultura e lisados em tampão de ensaio de radioimunoprecipitação - RIPA (50 mmol/L de cloridrato de Tris, 150 mmol/L de NaCl, 1% (v/v) de Triton X-100, 1% (w/v) de desoxicolato de sódio, e 0,1% (w/v) de SDS, pH 7.5) e comprimidos contendo coquetel de inibidores de protease (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), durante 30 min, macerados e sonicados individualmente. Como controle, vilos infectados e não tratados foram utilizados.

Lisados teciduais de ambas as condições experimentais acima descritas foram submetidas ao ensaio de proliferação de *T. gondii* de acordo com Teo e colaboradores (2007) e procedeu-se brevemente da seguinte maneira: numa placa de 96 poços, o lisado tecidual obtido (100 $\mu\text{L/well}$) foi incubado com 160 μL do tampão de ensaio (100 mM tampão fosfato, pH 7.3, 102 mM de mercaptoetanol e 9 mM MgCl_2) mais com 40 μL de substrato cromogênico clorofenol vermelho- β -d-galactopiranosídeo (CPRG). Depois de 30 min de incubação, a atividade enzimática da β -galactosidade foi aferida em leitora de placas a 570nm e os valores de DO convertidos em número total de taquizoítas de acordo com a curva padrão, utilizando o software Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA). Os dados foram apresentados como índice de proliferação de *T. gondii* (β -Gal) de acordo com a referência da curva padrão (limite de detecção da reação de $15,625 \times 10^3$ parasitos totais).

8. Imuno-histoquímica para a detecção de taquizoítas

Para estudo dos vilos à microscopia de luz os explantes foram fixados em formol 10% em tampão PBS durante 24 hs. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em álcoois de concentrações crescentes e embebidos parafina.

Cortes de 4µm foram desparafinizados, hidratados em álcoois de concentrações decrescentes e por fim em água corrente. Após hidratação, os cortes foram incubados por oito minutos em solução de ácido acético a 5 % para bloqueio da fosfatase endógena e, em seguida, lavados em solução salina tamponada com TRIS (TBS), pH 7,4 por 5 minutos. Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, os fragmentos foram incubados com soro normal de cabra a 2 % em TBS por 20 minutos a 37° C; após este bloqueio, foi feita a incubação do material com soro de *Calomys callosus* positivo contra cepa ME-49 de *T. gondii*, na diluição de 1:100 (produzido e cedido pelo Laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Uberlândia) em TBS por 12 horas a 4° C. Após sucessivas lavagens em TBS, os fragmentos foram incubados com IgG de cabra anti - IgG de camundongo biotinizada (Sigma, St Louis, USA) na diluição de 1: 600 em TBS por uma hora a 37° C. A reação foi amplificada pelo complexo avidina/biotina (ABC) - fosfatase (Biomeda, Foster city, USA) na diluição de 1:100 em TBS, a 37° C, por 30 minutos. A revelação da enzima fosfatase alcalina foi realizada com fast red – naftol (Sigma, St Louis, USA), em tampão TRIS por aproximadamente 8 min, lavagens em TBS e água corrente e contra-coloração com hematoxilina de Meyer, à temperatura ambiente. Com a diferenciação do corante em água amoniacal, as lâminas foram montadas com lamínulas em glicerina. Como controles da reação foram utilizados vilos infectados ou não, e sem tratamento.

9. Dosagem protéica dos vilos placentários

Explantes de vilos congelados foram homogeneizadas em tampão de ensaio de radioimunoprecipitação - RIPA (50 mmol/L de cloridrato de Tris, 150 mmol/L de NaCl, 1% (v/v) de Triton X-100, 1% (w/v) de desoxicolato de sódio, e 0,1% (w/v) de SDS, pH 7.5) e comprimidos contendo coquetel de inibidores de protease (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). O homogenado foi centrifugado a 15.000x g durante 15 minutos a 4° C. Os sobrenadantes foram então utilizados para a mensuração do conteúdo de proteína utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976). A concentração de proteína total (mg/mL) foi utilizada para normalizar os dados das citocinas obtidas por ELISA e CBA (pg/mL), resultando na concentração de citocinas (pg/mg).

10. Detecção de citocinas

10.1: Dosagem de IL-12, TNF- α , IL-10 e TGF- β 1 *por Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

As concentrações de IL-12, TNF- α , IL-10 e TGF- β 1 nos sobrenadantes de culturas de explantes de vilos placentários foram mensuradas por ELISA Captura, de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems). Brevemente, placas de alta afinidade de 96 poços (BD Biosciences) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-humanos específicos para cada citocina por 12 horas a temperatura ambiente; em seguida as placas foram lavadas com PBS-Tween (PBS-T 0,05%) e bloqueadas durante

1 hora a temperatura ambiente com PBS mais 1% de soro albumina bovina (BSA) para as citocinas IL-12, TNF- α , IL-10 ou PBS-T (5%) mais 0,05% de azida sódica para TGF- β 1. Após novas lavagens em PBS-T, 50 μ l das curvas de cada citocina (de 500 pg/mL a 15,6 pg/mL para IL-12 e TNF- α , de 4000 pg/mL a 62,5 pg/mL para IL-10; e de 2000 pg/mL a 31,25 pg/mL para TGF- β 1) ou 50 μ l das amostras de sobrenadantes de vilos placentários foram adicionados nas placas e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, após lavagens, as placas foram incubadas com anticorpos de detecção anti-citocinas humanas conjugados com biotina durante 2 horas a temperatura ambiente e, após este intervalo, estreptavidina conjugada com peroxidase foi adicionada às placas e permaneceu em incubação por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Finalmente, as placas foram novamente lavadas, reveladas com TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) mais 0,03% de peróxido de hidrogênio por 20 minutos e a densidade óptica foi mensurada por um leitor de microplacas a 450nm (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA). Os dados foram convertidos em pg/mL de acordo com a referência da curva padrão. Os limites de detecção do ensaio foram de 15 pg/mL para IL-12 e TNF- α , 62,5 pg/mL para IL-10 e 31,25 pg/mL para TGF- β 1. Os dados foram demonstrados em pg/mg após normalização pelo total de proteínas dos vilos.

No ensaio de detecção para TGF- β 1, os sobrenadantes foram primeiramente tratados com soluções de ácido e base para ativar a citocina presente na amostra, uma vez que TGF- β é secretado pelas células como um complexo inativo. O tratamento procedeu-se da seguinte forma: 10 μ l de HCl 1M foi misturado aos 50 μ l de sobrenadante e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 10 μ L de solução contendo 1,2 M de NaOH e 0,5M de Hepes foi adicionada aos sobrenadantes

previamente incubados com HCl para neutralizar a ação do ácido e, em seguida, as amostras foram colocadas nas placas de ELISA.

10.2: Dosagem de citocinas de perfil Th1/Th2 e IL-17A por citometria de fluxo

As citocinas humanas (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-17A) foram mensuradas nos sobrenadantes de vilos placentários usando o kit Th1/Th2/Th17 “Cytometric Bead ArrayTM” (CBA) (BD Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as amostras de sobrenadantes foram misturadas com uma mistura de “beads” de captura para cada citocina a ser quantificada. Em seguida, foram adicionados os anticorpos anti-humanos conjugados com ficoeritrina (PE) para IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α e IL-17A por 3 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os tubos foram então centrifugados (1300 rpm por 7 minutos) e os sobrenadantes cuidadosamente aspirados e descartados. O “pellet” contendo as “beads” foi homogeneizado e analisado por citometria de fluxo. As amostras foram analisadas no citômetro FACSCalibur BDTM (BD Company, San Diego, CA, EUA) e os dados foram analisados pelo software BDTM Cell Quest e CBA software. Os limites de detecção de cada citocina foram: 20,25 pg/mL para IL-2; 19,7 pg/mL para IL-4; 20,16 pg/mL para IL-6; 20,12 pg/mL para TNF- α ; e 19,1 pg/mL para IL-17A. Os dados foram demonstrados em pg/mg após normalização pelo total de proteínas dos vilos.

11. Ensaio de eletroquimioluminescência para dosagem de estradiol, progesterona e hCG+ β .

A análise da concentração de estradiol, progesterona e hCG+ β no sobrenadante de cultura foi realizada no Serviço de Análise Clínicas, Unidade de Hormônio, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, sendo determinada por eletroquimioluminescência usando sistema automatizado Cobas E-411, com Kit Roche[®] de uso de rotina do laboratório, conforme instruções do fabricante (Roche/Hitachi, Japão). A Eletroquimioluminescência consistiu num processo de reações químicas que geraram luminescência a partir de um estímulo elétrico. O imunoensaio baseou-se na utilização de um complexo de rutênio [Ru(bpi)₃]²⁺ e tripropilamina (TPA) associado a anticorpos. O produto quimioluminescente final foi formado durante o passo de detecção. A eletroquimioluminescência ocorreu quando foi aplicada uma corrente elétrica em um eletrodo de platina, criando um campo elétrico e fazendo com que todos os materiais nesse campo reagissem. Utilizando um ímã as micropartículas que se encontraram revestidas com complexos de antígeno - anticorpo foram uniformemente depositadas no eletrodo de trabalho. O ímã foi removido e depois foi aplicada a voltagem ao eletrodo onde estavam depositadas as micropartículas. A emissão de luz foi medida com um fotomultiplicador. No teste utilizado, a gonadotrofina corônica humana foi determinada *in vitro* pela somatória do hormônio intacto (hCG) com a subunidade β do hCG, assim a utilização do termo hCG + β .

12. Dosagem de Nitrito

A concentração de nitrito em explantes de placentas foi mensurada pelo método de Griess (Green et al., 1982). Brevemente, amostras foram adicionadas em placas de 96 poços. A seguir, foi acrescentado sulfanilamida 1% e diidrocloreto de naftaleno - NEED 0.1% (na proporção 1:1) em H_3PO_4 2.5%. A absorbância (A_{570}) foi determinada em leitor para microplacas a 570 nm (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA) com referência a uma curva padrão de nitrito de sódio – NaNO_2 (5-100 $\mu\text{mol/L}$).

13. Tratamento prévio com antibióticos do clone RH 2F1 de *T. gondii*

A ação dos antibióticos azitromicina e associação PSA foi observada diretamente sobre *T. gondii*, caracterizando um tratamento prévio dos parasitos antes de adicioná-los na cultura dos vilos. Taquizoítas (5×10^6) do clone RH 2F1 foram tratados em frascos de vidro com diferentes concentrações (50, 100, 200 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) de azitromicina ou PSA diluídos em meio de cultura durante 1 hora a 37°C em estufa de CO_2 . Posteriormente, todos os parasitos foram colocados em placas de cultura de tecido de 96 cavidades onde estavam sendo cultivados vilos placentários coletados previamente. Após 72 horas os vilos infectados foram também macerados em tampão de lise RIPA e sonificados individualmente. Como controle, vilos foram infectados com parasitos não previamente tratados com antibióticos.

Lisados teciduais experimentais acima descritos foram submetidos ao ensaio de proliferação de *T. gondii* de acordo com Teo e colaboradores (2007), conforme descrito anteriormente no item 7.

14. Análise estatística

Todos os dados foram analisados como média e desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Para a dosagem de citocinas e dosagem de hormônios, foram realizados 8 experimentos em triplicata. As diferenças entre grupos foram analisadas pelo teste ANOVA com comparações múltiplas de Bonferroni e as comparações entre condições pares foram realizadas pelo teste *t* de Student, usando o programa GraphPad Prisma versão 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). As diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

1. Parasitos da cepa RH e o clone RH 2F1 de *T. gondii* apresentaram similares índices de invasão e proliferação

Para verificar se a presença do gene da β -galactosidase bacteriana não teria um efeito significativo sobre as propriedades de invasão e taxa de proliferação em células BeWo de taquizoítos de *T. gondii*, o clone RH 2F1 foi comparado com a cepa RH. Para isso, células BeWo foram infectadas com a cepa RH ou com clone RH 2F1 de *T. gondii* e os índices de invasão e proliferação foram verificados. Foi observado que as cepas apresentaram comportamentos similares em relação ao número total de parasitos em 100 células quantificadas (442 e 490, respectivamente), índices de infecção (45% e 47%) e número de parasitos por célula (4,98 e 5,2, respectivamente). Assim, os resultados sugeriram que não existem diferenças significativas no parâmetro de invasão e proliferação entre os parasitos da cepa RH e clone RH 2F1 de *T. gondii* em células BeWo (Fig. 1a, b, c). Com base nestes resultados, os demais protocolos experimentais da presente investigação foram realizados com o clone RH 2F1 de *T. gondii*.

2. Toxicidade tecidual após infecção com *T. gondii* e tratamento com antibióticos

A toxicidade causada pelo tratamento com as drogas azitromicina (Fig. 2c) e a associação Pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico (Fig. 2c) levou a um aumento na produção de LDH, indicando dano tecidual. A Azitromicina nas concentrações de 1000 µg/mL (68,8 U/mL) e 5000 µg/mL (87,2 U/mL) e o PSA na concentração de 5000 µg/mL (75 U/mL) induziram a liberação de quantidades significativas de LDH em relação ao controle não infectado (41,8 U/mL) ($P < 0,05$). A infecção por *T. gondii* elevou a liberação de LDH (81,1 U/mL) em relação ao controle não infectado (41,8 U/mL) ($P < 0,05$), indicando que a simples presença do parasito induz dano celular. Entretanto, observou-se que a toxicidade celular foi significativamente maior nas amostras infectadas e tratadas com PSA na concentração de 5000 µg/mL (180 U/mL) em relação ao controle infectado (81,1 U/mL) ($P < 0,05$). A atividade de LDH foi mensurada usando-se o Kit LDH liquiform e expressa em U/mL ou em quantidades relativas de LDH, em relação à lise completa dos vilos obtida com Triton X-100 a 0,2% (“*High control*”). Vilos não tratados e não infectados (“*low control*”) e infectados (“*controle+Tg*”), serviram como controles do experimento (Fig. 2a). A cinética das diferentes concentrações de drogas, com ou sem infecção, também foi realizada, relacionando a toxicidade celular em porcentagem quanto à lise completa dos vilos pelo Triton X-100 (100%) (Fig. 2b).

Baseado nesses resultados, os experimentos seguintes foram realizados definindo as concentrações de 200 e 1000 µg/mL de azitromicina ou PSA para tratamentos dos vilos placentários.

3. Vilos placentários infectados e tratados com azitromicina ou PSA apresentaram menor índice de parasitismo tecidual.

A replicação intracelular dos parasitos do clone RH 2F1 de *T. gondii* em vilos placentários foi determinado após tratamento com concentrações crescentes de azitromicina ou PSA (Figura 3). Verificou-se redução no número de parasitos em ambas as concentrações (200 ou 1000 µg/mL) de azitromicina ou de PSA quando comparado com vilos não tratados ($P<0.05$). Quando as concentrações de cada grupo de tratamento foram comparadas, não foram observadas diferenças significativas, constatando um controle similar das duas drogas sobre a replicação do parasito no interior dos vilos placentários.

Fotomicrografias representativas de vilos placentários infectados e tratados ou não com azitromicina ou PSA estão demonstradas na figura 4. Imunomarcações dos taquizoítas foram observados em vilos placentários submetidos a todos os tratamentos; entretanto aqueles do grupo controle infectado (Fig. 4b) apresentaram quantidade de imunomarcações significativamente maior que o grupo de vilos tratados e infectados (Fig. 4c e 4d). Alterações morfológicas não foram visualizadas. A figura 4a representa vilos placentários não infectados (controle negativo).

4. Perfil da produção de citocinas produzidas por vilos placentários infectados e tratados com azitromicina ou PSA

Na tentativa de entender alguns aspectos dos inúmeros mecanismos de controle da infecção por *T. gondii* pelo sistema imune do hospedeiro, mensuramos as citocinas (IL-

12, TNF- α , TGF- β 1, IL-10, IL-2, IL-6, IFN- γ , IL-17A) por ELISA e por citometria de fluxo, no sobrenadante de cultura dos vilos placentários.

O perfil da produção de citocinas, avaliado por ELISA em vilos infectados ou não e tratados com azitromicina ou PSA em diferentes concentrações (Fig. 6) foi determinado para IL-12, TNF- α , TGF- β 1 e IL-10. A análise da produção de IL-12 revelou que vilos placentários não infectados e tratados com concentrações de 200 μ g/mL (12,6 pg/mg) e 1000 μ g/mL (8,8 pg/mg) de azitromicina não apresentaram variação significativa na produção desta citocina quando comparadas com o controle não infectado (14,4 pg/mg). A infecção por si induz o aumento na produção de IL-12 (25,1 pg/mg), sendo que o tratamento com azitromicina nestes vilos infectados não gerou alteração na produção de IL-12 (para a concentração de 200 μ g/mL – 26,8 pg/mg, de 1000 μ g/mL – 23,2 pg/mg). Apesar desta manutenção nos níveis de IL-12 durante o tratamento com azitromicina, houve redução no índice de proliferação de *T. gondii*. No entanto, o tratamento com PSA na concentração de 200 μ g/mL (30,8 pg/mg) induziu um aumento significativo na produção desta citocina ($P < 0.05$), enquanto para a concentração de 1000 μ g/mL não houve variação estatística (10,2 pg/mg). Nos sobrenadantes de vilos infectados e tratados com 200 μ g/mL (48,8 pg/mg) ou 1000 μ g/mL (54,9 pg/mg) de PSA, a produção de IL-12 aumentou consideravelmente ($P < 0.05$), sendo acompanhado por uma redução na proliferação de *T. gondii* (Fig. 5a).

Os dados de ELISA para TNF- α demonstraram que, comparando com o controle não infectado (131,2 pg/mg), o tratamento com 200 μ g/mL de azitromicina em vilos não infectados induziu aumento na produção desta citocina (303 pg/mg) ($P < 0.001$), enquanto na concentração de 1000 μ g/mL (96,3 pg/mg) os níveis de produção foram similares ao controle. Além disso, a presença de *T. gondii* levou a uma significativa redução na produção de TNF- α (8,3 pg/mg), quando comparado ao controle não

infectado ($P<0.01$), sendo que o tratamento com as concentrações de 200 ou 1000 $\mu\text{g/mL}$ de azitromicina manteve níveis similares de produção (9,0 e 7,8 pg/mg , respectivamente). Paralelamente foi observada redução na proliferação de *T. gondii*. Para o tratamento dos vilos com PSA houve redução nos níveis de $\text{TNF-}\alpha$, diretamente relacionada com a elevação da concentração da droga (para a concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ – 44,6 pg/mg , e de 1000 $\mu\text{g/mL}$ – 5,5 pg/mg) ($P<0.05$). Nas condições de infecção, não houve modificação nos níveis de $\text{TNF-}\alpha$ em ambas as concentrações de PSA, apesar disso, pode ser observada a redução da proliferação de *T. gondii* nos vilos placentários (Fig. 5b).

Os níveis de $\text{TGF-}\beta 1$ no sobrenadante de vilos placentários tratados com azitromicina sofreram redução significativa nas condições tratadas com 200 ou 1000 $\mu\text{g/mL}$ de azitromicina (1199,5 e 1378,9 pg/mg , respectivamente) quando comparadas ao controle não tratado (2205,0 pg/mg) ($P<0.05$). A infecção levou à redução na produção de $\text{TGF-}\beta 1$ (998,2 pg/mg), sendo que o tratamento com azitromicina não ocasionou modificação na produção de $\text{TGF-}\beta 1$ (para a concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ – 1331,4 pg/mg , de 1000 $\mu\text{g/mL}$ – 1055,4 pg/mg), apesar da redução do índice proliferação de *T. gondii* nos vilos placentários. Durante o tratamento com PSA não houve variação significativa na produção de $\text{TGF-}\beta 1$, tanto nas condições sem infecção (para a concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ – 2031,0 pg/mg , e de 1000 $\mu\text{g/mL}$ – 2370,7 pg/mg) quanto na infecção com *T. gondii* (para a concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ – 848,1 pg/mg , e de 1000 $\mu\text{g/mL}$ – 1607,8 pg/mg) em comparação aos respectivos controles. Nestas condições foi ainda observada a redução da proliferação de *T. gondii* nos vilos placentários (Fig. 5c).

No tratamento de vilos placentários com azitromicina em todas as condições, infectados ou não por *T. gondii*, a produção de IL-10 apresentou níveis similares em

relação aos controles não infectados e não tratados (1293,0 pg/mg) e infectados (1994,8 pg/mg). Foi observada redução na proliferação de *T. gondii*, concomitante ao tratamento com azitromicina. Em relação ao tratamento com PSA, houve um aumento na produção de IL-10 em sobrenadantes de vilos não infectados e tratados com 1000 µg/mL (2396,3 pg/mg) ($P<0.05$). Após a infecção, verificou-se redução na produção desta citocina para ambas as concentrações de PSA (para a concentração de 200 µg/mL – 991,8 pg/mg, e de 1000 µg/mL – 846,7 pg/mg) ($P<0.05$), coincidente com a redução na proliferação de *T. gondii* (Fig. 5d).

Os dados de citometria de fluxo demonstraram que os sobrenadantes de vilos placentários, infectados ou não com *T. gondii*, tratados tanto com azitromicina ou PSA, não apresentaram diferença significativa na secreção de IL-2 quando comparados aos controles. Entretanto, não houve secreção detectável de IL-2 para os seguintes grupos experimentais: vilos tratados com azitromicina não infectados nas concentrações de 200 e 1000 µg/mL, bem como para as concentrações de 200 ou 1000 µg/mL de PSA não infectados, 200 µg/mL de PSA infectado e controle infectado. Foi observado ainda, que na concentração de 1000 µg/mL de azitromicina ou PSA, à medida que há redução do índice de proliferação, ocorre elevação na secreção de IL-2 (Fig. 6a).

Vilos placentários não infectados e tratados com concentrações de 200 µg/mL (1208,0 pg/mg) e 1000 µg/mL (2884,9 pg/mg) de azitromicina produziram IL-6 semelhante ao controle não infectado (4193,7 pg/mg), não apresentando variação significativa na produção desta citocina. Entretanto durante a infecção com *T. gondii*, ocorreu redução na secreção de IL-6 no grupo controle infectado (1519,9 pg/mg, $P<0.01$), enquanto o tratamento com 200 µg/mL de azitromicina estimulou o aumento desta secreção (4366,9 pg/mg, $P<0.01$). Na condição sem infecção foi detectado aumento na secreção desta citocina mediante tratamento com 200 e 1000 µg/mL de PSA

(10281,2 e 6822,7 pg/mg, respectivamente) quando comparados aos vilos não tratados, sugerindo a interferência destas drogas no metabolismo do vilo ($P<0.05$). Contudo, durante a infecção com *T. gondii* e tratamento com PSA, os níveis de IL-6 foram similares ao controle. Concomitantemente, constatou-se a diminuição na produção de IL-6 coincidindo com a redução da proliferação de *T. gondii* nos vilos placentários para ambos os tratamentos (Fig. 6b).

Os sobrenadantes de vilos placentários, infectados ou não com *T. gondii*, não apresentaram diferença significativa na produção de IFN- γ quando comparados aos controles, apenas com secreção em níveis basais desta citocina. Não houve alteração na secreção de IFN- γ apesar da redução no índice de proliferação de *T. gondii* (Fig. 6c).

Os resultados referentes à secreção de IL-17A demonstraram que os vilos, infectados ou não pelo parasito, secretaram níveis de IL-17A estatisticamente semelhantes aos seus respectivos controles, incluindo as condições experimentais de tratamentos (Fig. 6d). Entretanto, os vilos placentários não infectados sob tratamento com 200 $\mu\text{g/mL}$ de azitromicina (1,1 pg/mg), secretaram menos IL-17A quando comparados ao seu controle não tratado (18,2 pg/mg) ($P<0.05$). Assim, não houve alteração na secreção de IL-17A, apesar de ter havido redução do índice de proliferação de *T. gondii*.

Os resultados obtidos para IL-4 foram inferiores ao limite de detecção em todas as condições analisadas (dados não mostrados).

5. Perfil da produção de estradiol, progesterona e hCG+ β em vilos placentários

Com o propósito de compreender possíveis alterações no perfil de produção hormonal durante o tratamento com azitromicina ou associação de PSA e infecção com *T. gondii*, foi realizada análise por eletroquimioluminescência da concentração de estradiol, progesterona e hCG+ β no sobrenadante de cultura de vilos placentários.

Os resultados obtidos mostraram similaridade no perfil de produção dos hormônios. Um aumento na secreção dos hormônios estradiol, progesterona e hCG+ β foi observado no sobrenadante de vilos placentários infectados por *T. gondii* quando comparado com os respectivos controles. Entretanto, apesar do aumento de produção hormonal induzido pela presença de *T. gondii*, observou-se redução desta secreção à medida que os explantes foram tratados com os antibióticos. Este índice foi acompanhado pela redução no índice de proliferação de *T. gondii*, para os tratamentos com azitromicina e PSA (Fig. 7a-c).

Para o grupo tratado com azitromicina, não foi observada diferença estatística com o controle não infectado (287,52 pg/mg). A exceção foi observada com a redução na produção de estradiol para o grupo tratado com 1000 $\mu\text{g/mL}$ de azitromicina (150,1 pg/mg). Durante a infecção houve redução na produção de estradiol, durante o tratamento com 200 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ de azitromicina (369,2 e 291,5 pg/mg, respectivamente) em relação ao controle infectado não tratado (512,2 pg/mg) (Fig. 7a). Para a progesterona os índices foram estatisticamente semelhantes, enquanto que para o hCG+ β na presença de *T. gondii*, o tratamento com 1000 $\mu\text{g/mL}$ de azitromicina (26,8 mIU/mg) reduziu este índice quando comparado com o controle infectado não tratado (52,6 mIU/mg) (Fig. 7b-c).

No que se refere à produção de estradiol, os vilos placentários tratados com 1000 µg/mL de PSA (525,2 pg/mg) apresentaram um significativo aumento na produção deste hormônio em relação ao controle não tratado (287,5 pg/mg) ($P < 0.001$). Durante a dosagem de progesterona, o aumento na secreção foi observado para este mesmo grupo de tratamento (1000 µg/mL de PSA- 71,7 ng/mg. Controle não tratado – 34,6 ng/mg). No tratamento com PSA e durante a infecção por *T. gondii*, houve redução na secreção dos três hormônios: Para o estradiol, 200 e 1000 µg/mL (214,3 e 100,8 pg/mL, respectivamente) comparado com o controle infectado (512,2 pg/mL); para a progesterona 200 e 1000 µg/mL (28,8 e 12,8 ng/mL) em relação ao controle infectado (83,6 ng/mL); e para a produção de hCG+β, 200 e 1000 µg/mL (6,7 e 6,6 mIU/mg) comparado com o controle infectado (52,6 mIU/mg) (Fig. 7a-c).

6. Produção de Nitrito

Para verificar se os explantes placentários responderiam à infecção por *T. gondii* e à ação das drogas por meio da produção de óxido nítrico (NO), os sobrenadantes de cultura foram utilizados para mensuração de nitrito pelo método de Griess. Nenhuma produção de nitrito foi detectada nas condições experimentais (dados não mostrados).

7. O tratamento prévio de taquizoítas de *T. gondii* com azitromicina ou PSA reduziu a infecção em vilos placentários

Para averiguar o efeito direto dos antibióticos (azitromicina ou PSA) sobre *T. gondii*, parasitos do clone RH 2F1 foram tratados previamente com diferentes

concentrações (50, 100, 200 e 1000 µg/mL) dos antibióticos, diluídos em meio de cultura, durante 1 hora a 37°C em estufa de CO₂. Paralelamente, como controle do experimento, parasitos não submetidos ao tratamento permaneceram nas mesmas condições que os tratados. O tratamento prévio com azitromicina reduziu a proliferação de *T. gondii* em todas as concentrações (50 µg/mL – $15,8 \times 10^4$; 100 µg/mL – $12,7 \times 10^4$; 200 µg/mL – $10,5 \times 10^4$; 1000 µg/mL – $8,4 \times 10^4$) sendo que o efeito foi estatisticamente diferente entre as diferentes concentrações da azitromicina ($P < 0.05$). Com relação ao tratamento prévio com PSA, também foi observada uma diminuição na replicação do parasito em todas as concentrações (50 µg/mL – $14,2 \times 10^4$; 100 µg/mL – $12,1 \times 10^4$; 200 µg/mL – $13,6 \times 10^4$; 1000 µg/mL – $11,7 \times 10^4$), quando comparado à condição sem tratamento ($P < 0.05$). Os resultados sugerem a ação direta da droga sobre o parasito. Comparando-se os grupos de tratamento, foi observada diferença estatística entre o grupo tratado com 50 µg/mL de azitromicina e os grupos de 100 e 1000 µg/mL de PSA ($P < 0.05$ e $P < 0.01$, respectivamente) e o grupo tratado com 1000 µg/mL de azitromicina e os grupos de 50, 100 e 200 µg/mL de PSA ($P < 0.001$, $P < 0.05$ e $P < 0.01$, respectivamente) (Fig. 8).

DISCUSSÃO

O tratamento convencional da toxoplasmose em mulheres gestantes é baseado na administração de espiramicina ou na combinação de pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico em casos positivos de infecção fetal (Remington et al, 2001). No entanto, numerosos danos de toxicidade e efeitos teratogênicos são observados durante este tratamento (Chêne, Thiébaud, 2009). A pirimetamina é um antibiótico teratogênico, por ser antagonista do ácido fólico. Sua atuação inibe a síntese de enzimas que participam da via da síntese de folato, impedindo a duplicação do DNA celular, e, por isso, sua utilização durante o primeiro trimestre tem sido associada a um risco potencial de defeitos do tubo neural (Hernandez-Diaz et al, 2001). Além disso, apresenta efeitos tóxicos dose-dependente, produzindo danos tais como depressão da medula óssea, alterações cromossômicas e mutagenicidade, sendo que todos os pacientes tratados com pirimetamina necessitam de frequentes monitoramentos por hemograma (Hernandez-Diaz et al, 2001; Vijayalaxmi, Vishalakshi, et al, 2000). Neste sentido, o estudo de medicamentos alternativos para o tratamento da toxoplasmose durante a gestação é necessário para estabelecer novas estratégias terapêuticas que minimizem os danos tóxicos, teratogênicos ou mutagênicos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o papel de azitromicina contra infecção por *T. gondii* em explantes placentários humanos de terceiro trimestre gestacional em comparação com a terapia tradicional (pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico - PSA).

Inicialmente, para avaliarmos os índices de infecção e proliferação em nosso modelo experimental, optamos pela utilização do clone RH 2F1 de *T. gondii*. No entanto, com o intuito de verificar se a presença do gene da β -galactosidase bacteriana não modificaria as taxas de invasão e de proliferação, o clone RH 2F1 foi comparado

com a cepa RH não modificado de *T. gondii*. Em nosso modelo experimental observamos similares índices de invasão e proliferação de taquizoítos de *T. gondii* tanto de parasitos da cepa RH quanto do clone RH 2F1. Quando se trata de tecidos, a contagem visual direta da proliferação do parasito é prejudicada, por se tratar de uma estrutura tridimensional, onde o corte da amostra para obtenção de lâminas pode não acontecer no local onde o parasito se encontra. Assim, inúmeras técnicas podem ser utilizadas para a detecção da proliferação do parasito em tecidos, tais como ensaio de incorporação de uracil, PCR (Reação em cadeia da Polimerase), ou, ainda compostos radiomarcados (McFadden et al, 1997; Kul et al, 2012; Rahumatullah et al, 2012). Entretanto, o desenvolvimento de clones de *T. gondii* que expressam β -galactosidase bacteriana torna possível a utilização de simples ensaios colorimétricos para avaliar a proliferação do parasito e atividade de novos compostos quimioterapêuticos para tratamento da toxoplasmose (McFadden et al, 1997; Teo et al, 2007).

No presente estudo avaliamos a atividade de liberação de LDH como medida indireta da viabilidade e citotoxicidade de vilos placentários infectados ou não por *T. gondii*, causada por diferentes doses de azitromicina ou da associação PSA. Os resultados obtidos demonstraram que ambos os antibióticos não causaram toxicidade significativa local quando a liberação de LDH foi aferida nos sobrenadantes das culturas, embora vilos placentários infectados por *T. gondii* e tratados com 5000 $\mu\text{g/mL}$ de PSA apresentaram alto nível de LDH, demonstrando nível de citotoxicidade de 90% em relação ao controle lisado total ("High control"). Estes achados sugerem que a escolha de doses menos concentradas de PSA são desejáveis, uma vez que reações adversas são fortemente dependentes da dose dos antibióticos, tanto para pirimetamina quanto para sulfadiazina (Vijayalaxmi, Vishalakshi, 2000).

Após análise de citotoxicidade, a proliferação intracelular de *T. gondii* foi avaliada mediante tratamento com azitromicina ou PSA. Observou-se que a azitromicina reduziu a proliferação intracelular de *T. gondii* em ambas as concentrações (200 ou 1000 µg/mL), assim como o tratamento com PSA. Assim definimos pelas doses de 200 e 1000 µg/mL para azitromicina ou PSA.

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que células trofoblásticas da linhagem BeWo foram capazes de controlar a invasão e proliferação de *T. gondii* (cepa RH) quando tratados com azitromicina (Franco et al, 2011). Além disso, a azitromicina também apresentou papel protetor contra a cepa ME-49 de *T. gondii* no roedor *Calomys callosus*, uma vez que reduziu a transmissão vertical do parasito, sendo a infecção restrita aos tecidos placentários, sem evidência de infecção fetal (Costa et al, 2009). Além disso, o mesmo estudo demonstrou que o número de taquizoítas e bradizoítas de *T. gondii* diminuiu significativamente quando comparado com *C. callosus* não tratados ou tratados com PSA, mostrando que a azitromicina foi mais eficaz neste modelo experimental de estudo em relação à terapia convencional (Costa et al, 2009). Entretanto, em nosso modelo de vilos placentários humanos não foi verificada uma maior eficácia de azitromicina contra a infecção por *T. gondii* em comparação com tratamento com PSA. No entanto, apesar da azitromicina não ter apresentado maior efeito protetor contra *T. gondii* em relação ao tratamento convencional, a grande vantagem de azitromicina como droga alternativa reside no fato deste antibiótico não causar efeitos teratogênicos, podendo ser administrada de forma segura a qualquer momento dos três trimestres da gestação (Chico et al, 2008; Pereira et al 2011; Chico, Chandramohan, 2011).

A azitromicina diminuiu a incidência do desenvolvimento de toxoplasmose ocular em fetos de *C. callosus* infectados por parasitos da cepa ME-49 de *T. gondii* (Lopes et

al, 2009), e, do mesmo modo, os tratamentos com azitromicina e a associação de pirimetamina e sulfadiazina também demonstraram a mesma capacidade para controlar a toxoplasmose ocular humana (Bosch-Driessen et al, 2002).

O sucesso da infecção por *T. gondii* é dependente de um delicado balanço entre a resposta imunológica do hospedeiro, que tenta eliminar o parasito, e as estratégias de evasão ou imunomodulação desempenhadas pelo parasito. A capacidade da gestação de afetar o sistema imune, e, por outro lado, o sistema imune de afetar a gestação tem duas consequências para o parasito. Primeiro, a imunomodulação que ocorre durante a gestação pode favorecer a sobrevivência de muitos parasitos, os quais exigem uma resposta inflamatória do tipo Th1 para controlá-los. Durante a gestação, a expressão aumentada de citocinas de perfil Th2 pode favorecer a infecção placentária e fetal por *T. gondii* e consequentemente aumentar a susceptibilidade à toxoplasmose (Abou-Bacaret et al., 2004). Entretanto, se houver uma maior expressão de citocinas de perfil Th1, pode afetar adversamente a gestação, sendo prejudicial ao feto, sendo que muitas vezes resulta em abortamento (Denkers, 2010). Desta maneira, a existências destas duas situações (gestação/infecção) impõem ao organismo materno adaptações que devem convergir para um padrão de resposta imune, considerando a necessidade de se estabelecer uma gestação saudável e ao mesmo tempo proteção contra a infecção fetal (Abou-Bacaret et al., 2004).

Vilos placentários não infectados e tratados com azitromicina mostraram aumentada secreção de TNF- α e reduzida produção de IL-17A. As citocinas de perfil Th1, tais como TNF- α , são produzidas durante infecção aguda por *T. gondii*, sendo referidas como sendo potencialmente deletérias para a concepção, por perturbar o equilíbrio imunológico materno-fetal. Alguns estudos sugerem que maiores distúrbios em gestação concomitante à infecção por *T. gondii* em camundongos C57BL/6 podem

estar associados a uma maior resposta inflamatória que conduz a apoptose celular e necrose dos sítios de implantação em comparação com a linhagem BALB/c (Coutinho et al, 2012).

Na presente investigação, a infecção por *T. gondii* e o tratamento com azitromicina induziram aumento de IL-6 (200 µg/mL) e de IL-2 (1000 µg/mL) e, estes resultados, foram associados com a redução da proliferação intracelular de *T. gondii* no modelo experimental utilizado. A expressão de IL-6 na interface materno-fetal parece ser crucial para a migração e invasão do trofoblasto no endométrio (Meisser et al., 1999). IL-6 participa da indução da liberação de hormônios, como a gonadotrofina coriônica humana (βhCG) em células BeWo (Tsukihara et al., 2004) e em outros modelos de trofoblasto humano (Li et al., 1992). O aumento dos níveis de IL-6 está envolvido em alguns aspectos da patogênese da pré-eclampsia, demonstrando a importância de IL-6 na interface materno-fetal (Uchide et al, 2012). IL-2 faz parte de um grupo de citocinas potencialmente inflamatórias, secretadas por linfócitos T CD4⁺ (Silva; Langoni, 2009), que atuam no recrutamento de novos linfócitos T CD4⁺, promovendo a ativação de células TCD8⁺ ou células citolíticas, que produzem enzimas proteolíticas – granzimas e perforinas, capazes de romper a membrana de parasitos livres ou células infectadas pelo mesmo (Subauste; Koniaris; Remington, 1991).

Em nossos resultados, vilos placentários não infectados e tratados com azitromicina mostraram, ainda, reduzida produção de IL-17A. A citocina IL-17 e suas células secretoras foram envolvidas no desenvolvimento de muitas doenças infecciosas, como a causada por *T. gondii* e outros parasitos. Um estudo recente demonstrou a relação de células Th17 na inflamação do sistema nervoso central (Kelly et al, 2005). Em gestação saudável, o número de células Th17 na decidua é significativamente elevada quando comparada com a do sangue periférico, sugerindo que a transmigração

celular de Th17 pode ser importante para uma gestação de sucesso (Crome, Wang, Levings, 2010; Zhang et al, 2012)

Em nossos resultados, o tratamento com PSA aumentou a produção de IL-6 e diminuiu TNF- α ; com a infecção houve aumento da produção de IL-12 e redução de IL-10. Respostas imunes anti-inflamatórias mantêm a tolerância durante a gestação por secreção de IL-10 e TGF- β (Zhang et al, 2012). Estudos do nosso grupo mostraram que o efeito de IL-10 em células trofoblásticas BeWo infectadas por *T. gondii*, aumenta significativamente a invasão e proliferação intracelular do parasito em células BeWo infectadas (Barbosa et al, 2008). Nossos estudos ainda mostraram que azitromicina induziu maior produção do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), TNF- α e IFN- γ em células trofoblásticas BeWo infectadas ou não por *T. gondii* (Franco et al., 2011).

A eficácia clínica da azitromicina foi melhor que a doxíciclina no tratamento da infecção por *Clamidia trachomatis* em mulheres com complicação como a infertilidade. Os autores demonstraram que após tratamento com azitromicina houve inibição de citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α em cultura de células mononucleares cervicais de mulheres férteis ou inférteis e com infecção primária ou recorrente por *C. Trachomatis* (Srivastava et al, 2012). No trabalho citado, assim como em nossos resultados, não houve detecção dos níveis de IL-4 no sobrenadante de cultura.

Em relação à produção das citocinas IL-12, TGF- β 1, IL-10 e IFN- γ , nossos resultados demonstraram que não houve variação significativa com o tratamento azitromicina, sugerindo que o medicamento interfere no mecanismo vital do *T. gondii*, sem afetar significativamente a secreção de citocinas por vilos placentários.

As alterações hormonais e imunológicas que ocorrem ao longo do período gestacional são necessárias para conduzir uma gestação saudável, porém afetam

drasticamente a susceptibilidade feminina a doenças autoimunes e infecciosas (Miyaura, Iwata 2002). Enquanto muitos estudos relatam mudanças na patogênese de doenças autoimunes e infecciosas por fatores imunológicos ao longo da gravidez, poucos estudos consideram o papel que os hormônios desempenham na modulação dessas alterações imunológicas (Robinson, Klein, 2012). Quanto relacionamos a produção hormonal, observamos que a simples presença de *T. gondii* aumentou a produção de estradiol, progesterona e hCG. Na gestação observa-se modificações no balanço da resposta imunológica importantes para evitar a rejeição ao feto semi-alógráfico (Miyaura, Iwata 2002). A progesterona estimula um perfil anti-inflamatório durante a gestação, coincidindo com a melhora dos sintomas de doenças como, esclerose múltipla, artrite reumatoide e psoríase, típicas doenças de perfil pró-inflamatório; enquanto o lúpus eritematoso sistêmico, uma doença de perfil tipicamente anti-inflamatório, tende a agravar os sintomas durante a gestação (Wilder, 1998; Ostensen, 1999).

Nossos resultados mostram aumento na produção hormonal induzido pela presença de *T. gondii* mas, também, redução na secreção de estradiol, progesterona e hCG à medida que os explantes foram tratados com os antibióticos, coincidindo com o controle da proliferação do parasito. Em algumas doenças infecciosas já foi descrito que a progesterona e glicocorticoides estão associados com a diminuição da resistência de camundongos a leishmaniose (Krishnan, et al., 1996), toxoplasmose (Luft, Remington, 1982) e malária (Menendez, 1995). Em camundongos, o estradiol está associado com o aumento da morbidade destes animais à toxoplasmose, enquanto a gonadectomia reduz esta patogenia (Robinson, Klein, 2012). A alta concentração de progesterona também aumenta a susceptibilidade a *T. gondii* durante a gestação, por suprimir a produção de IL-12 e IFN- γ (Jones et al, 2010). O hormônio hCG, secretado pelo blastocisto

imediatamente após a fecundação, apresenta capacidade de inibir a imunidade materna contra os antígenos paternos ao estimular a migração de células T reguladoras para o útero durante a gestação (Bansal et al, 2012). Desta maneira, o hCG promove a regulação da relação imune materno-fetal ao intervir no desenvolvimento de tolerância imunológica local (Zhang et al, 2012). Além disso, regula o sistema de apoptose via Fas/Fas-ligante e é responsável, inclusive, por diferentes eventos da gestação como a manutenção do corpo lúteo, estímulo para produção de progesterona, controle da diferenciação do trofoblasto e angiogênese uterina (Tsampalas et al, 2010).

Assim, é razoável supor que os antibióticos aqui utilizados puderam ter seus efeitos microbicidas potencializados por terem também reduzido a produção hormonal pelos vilos placentários.

Óxido Nítrico (NO) funciona em diversos tipos celulares como um importante fator de inibição do crescimento de *T. gondii*. Apesar disso, constatamos que explantes placentários infectados com *T. gondii* e/ou tratados com azitromicina e PSA não produziram nitrito (dados não mostrados). Resultados semelhantes foram descritos por outros estudos. Oliveira e colaboradores (2005) e Pffaf e colaboradores (2005) trabalhando com células BeWo infectadas com *T. gondii* e Ferro e colaboradores (2008) com explantes placentários de primeiro trimestre, demonstraram não haver produção de NO nos modelos estudados.

Nossos resultados sugerem que a azitromicina e PSA agem diretamente sobre o *T. gondii*, inibindo a proliferação do parasito no interior dos vilos placentários humanos. Entretanto o mecanismo de controle do parasito ainda não foi totalmente compreendido. Parasitos do filo apicomplexa incluindo *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Babesia*, *Theileria*, *Sarcocystis* e *Hepatozoon* possuem um plastídeo, denominado apicoplasto, que recentemente foi reconhecido como um sítio alvo de ligação de determinadas

drogas e herbicidas que apresentam ação antiparasítica (Fichera, Roos, 1997; Müller, Hemphill, 2011). Curiosamente, o bloqueio das atividades do plastídeo não costuma resultar em morte imediata do parasito, em *T. gondii*, por exemplo, a atividade parasiticida dos inibidores de plastos só é detectada quando taquizoítas tentam estabelecer a infecção no interior de uma nova célula hospedeira (McFadden, Roos, 1999). A azitromicina, um análogo semi-sintético da eritromicina, tem como alvo a subunidade 70 S do ribossomo do complexo apical, em microorganismos suscetíveis como *P. falciparum* e *P. vivax* (Chico, Chandramohan, 2011). Foi verificado anteriormente que, *in vitro*, o potencial da azitromicina como um inibidor de RNAm, é maior contra a descendência de parasitos que herdaram um apicoplasto não funcional pela exposição da droga. Cria-se, assim, um efeito de morte retardada, pela formação de uma segunda geração de parasitos incapazes de estabelecer vacúolos parasitóforos (Dahl, Rosenthal, 2008; Chico et al, 2008; Wu et al, 2009).

A azitromicina é um macrolídeo de nova geração com numerosas vantagens, tais como melhor farmacocinética e maior concentração no tecido se comparado à pirimetamina, menor incidência de efeitos secundários, incluindo a de menor hepatotoxicidade, e administração necessária apenas de uma vez por dia (Salman et al, 2010). O tratamento com azitromicina *in vivo*, demonstrou eficácia contra o *P. falciparum* em humanos, por reduzir a febre em 28% dos indivíduos infectados (Chico et al, 2008). Esses efeitos foram melhores evidenciados quando a azitromicina foi coadministrada em combinação com cloroquina contra *P. falciparum*, sendo a parasitemia minimizada no 7º dia de infecção em 97% dos pacientes, sem nenhuma recrudescência, sugerindo que a azitromicina foi mais protetora quando associada com outras drogas (Chico et al, 2008). A azitromicina também apresentou efeitos protetores contra doenças sexualmente transmissíveis durante a gravidez, como infecções

provocadas por *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e *Chlamydia trachomatis* (Chico, Chandramohan, 2011; Srivastava et al, 2012). Além disso, azitromicina demonstrou eficácia contra outras infecções, como a babesiose (Raju et al, 2007), *Neospora caninum* (Lindsay et al, 1994), a *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *Leishmania* (*L. Chagasi*) (Oliveira-Silva et al, 2008). Entretanto, são necessários mais estudos para validar o real papel do plastídeo enquanto alvo para drogas parasiticidas - mas já está claro que esta área tem a promessa considerável como projeto racional para avaliação da ação de novos medicamentos.

Em conjunto, os nossos dados demonstraram que azitromicina é capaz de controlar a infecção por *T. gondii* em explantes placentários humanos de terceiro trimestre, atuando diretamente na proliferação do parasito. Os nossos resultados sugerem a azitromicina como uma droga alternativa para o tratamento da toxoplasmose congênita, ampliando as estratégias terapêuticas utilizadas para controlar o parasito na interface materno fetal.

FIGURAS

Figura 1: Comparação da capacidade de infecção e proliferação entre a cepa RH e clone RH 2F1 de *T. gondii*. Células BeWo (1×10^5) foram cultivadas em lamínulas por 24 horas, em placas de 24 poços, infectadas com parasitos (5×10^5 parasito/poço/200 μ L) e mantidas por 24 horas adicionais. As lamínulas foram lavadas, fixadas, coradas com azul de toluidina e analisadas por microscopia de luz para observação dos parâmetros de infecção (média e porcentagem do número de parasitos por células em 100 células infectadas) (**a** e **b**) e replicação intracelular do parasito (número de parasitos por célula infectada) (**c**). Os dados estão expressos em média \pm SEM e são representativos de três experimentos independentes em triplicata. (teste *t* de Student, $p < 0,05$).

Figura 1

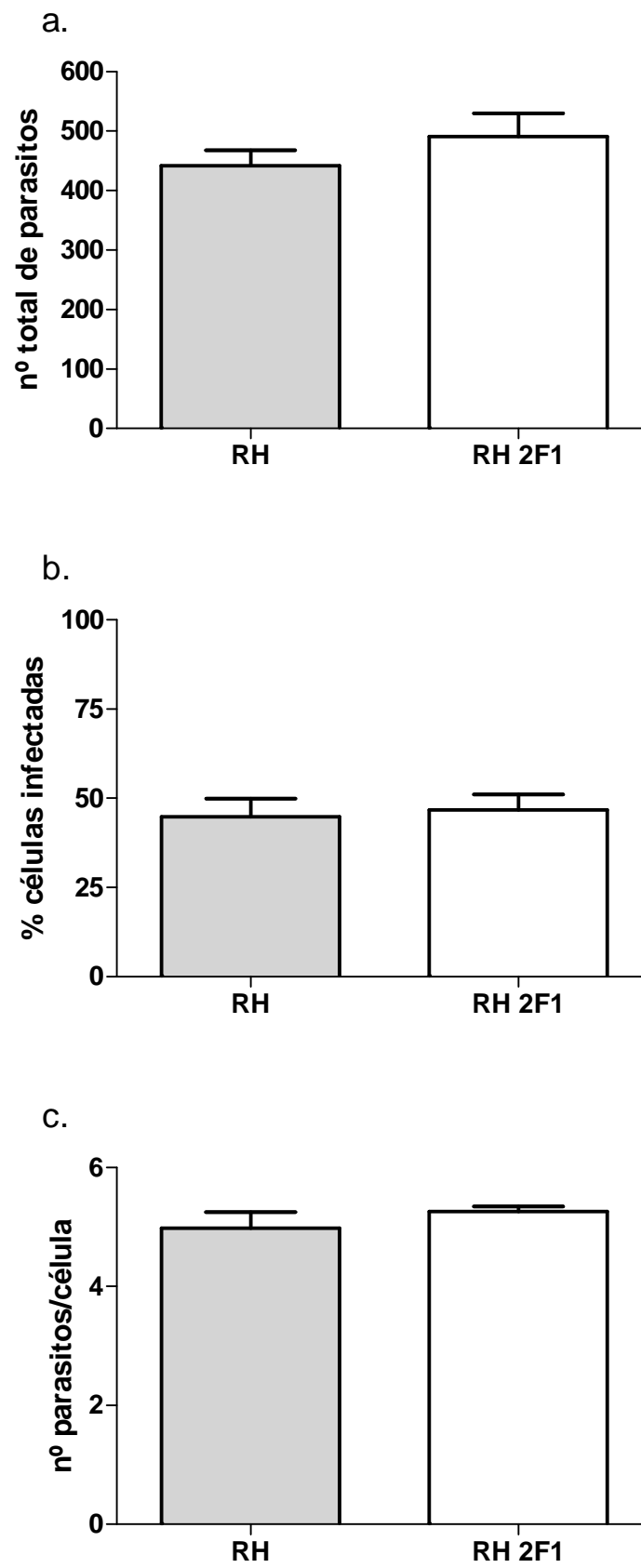


Figura 2: Detecção da toxicidade tecidual dos vilos placentários após tratamento com azitromicina ou associação PSA e infecção ou não por *T. gondii*. Os vilos placentários foram cultivados em placas de 96 poços a 37 °C e 5% de CO₂, com ou sem infecção (1x10⁶ taquizoítas por poço) com o clone RH 2F1 de *T. gondii*. Após 48 horas, os vilos foram tratados com concentrações crescentes de azitromicina (c) ou PSA (d) por adicionais 24 horas. A atividade de LDH foi mensurada usando-se o Kit LDH liquiform e expressa em U/mL ou em quantidades relativas de LDH em relação a lise completa de vilos obtida com Triton X-100 a 0,2% (“*High control*”). Vilos placentários não tratados e não infectados (“*low control*”) ou infectados (“controle+Tg”) foram utilizados como controles dos experimentos (a). Cinética das diferentes concentrações de drogas, com ou sem infecção, demonstrando a toxicidade celular em porcentagem relativa à lise completa dos vilos pelo Triton X-100 (100%) (b). Testes One-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni e expressos como média ± SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. (*) Diferença em relação ao controle não infectado. (#) Diferença com o controle infectado. (φ) Diferença entre grupo infectado e não infectado.

Para três símbolos, $P < 0,001$. Para dois símbolos, $P < 0,01$. Para um símbolo, $P < 0,05$.

Figura 2

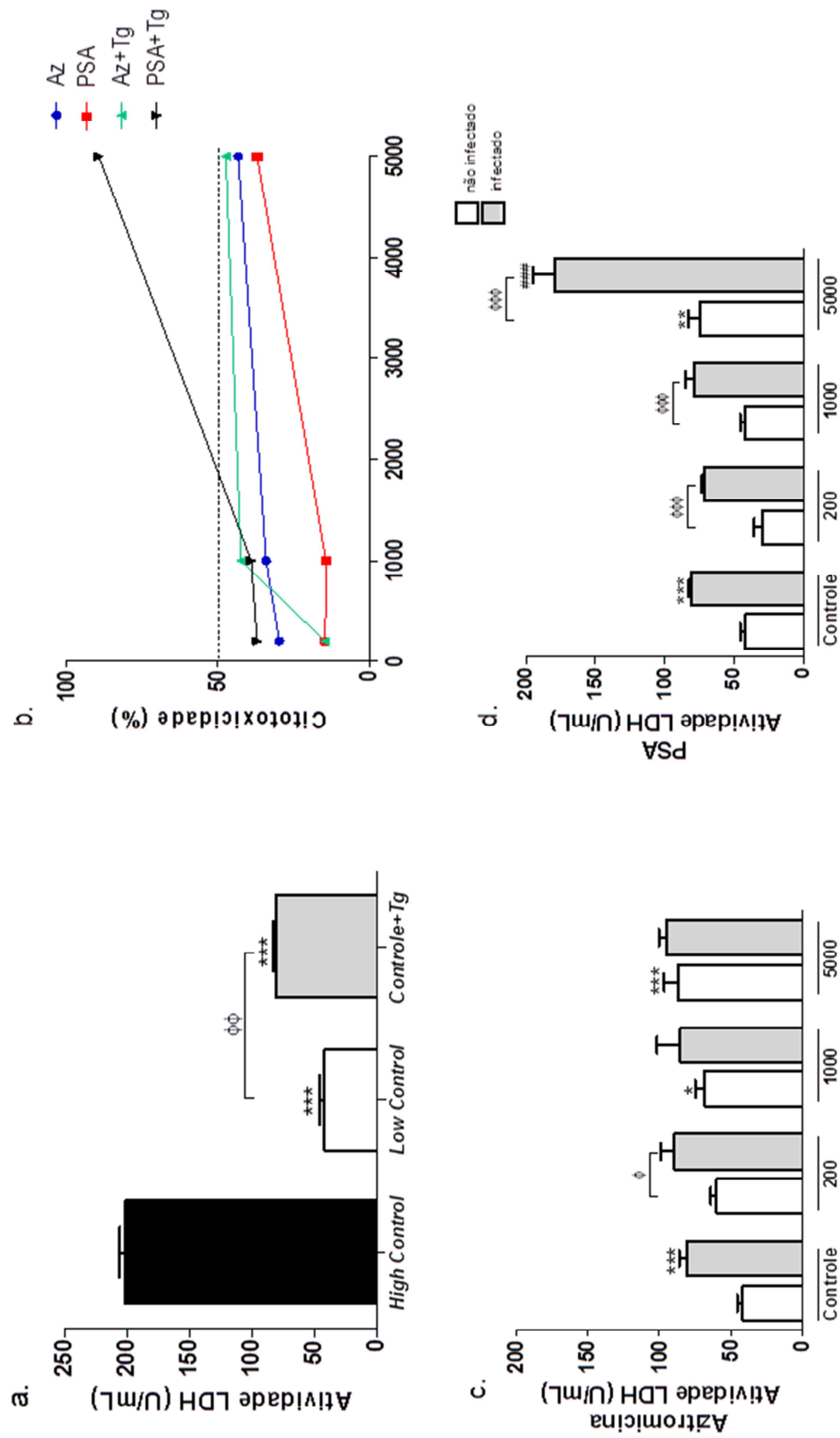


Figura 3: Índice de proliferação do clone RH 2F1 de *T. gondii* em vilos placentários, tratados com azitromicina ou PSA nas concentrações de 200 e 1000 µg/mL. As vilosidades de terceiro trimestre foram coletadas e cultivadas número de células em placas de 96 poços e após 24 horas foram infectadas com 1×10^6 taquizoítas de *T. gondii*/poço. Depois de 48 horas foram tratadas com azitromicina ou a associação de drogas (PSA) e mantidas por 24 horas em condições de cultura. Os explantes foram então submetidos ao ensaio de proliferação de *T. gondii* através da reação de β -galactosidade. Os dados expressam a média \pm SEM de cinco experimentos independentes em triplicata. O teste estatístico utilizado foi One-Way ANOVA com pós teste de Bonferroni. (*) Comparação com o controle infectado e não tratado. $P < 0,05$.

Figura 3

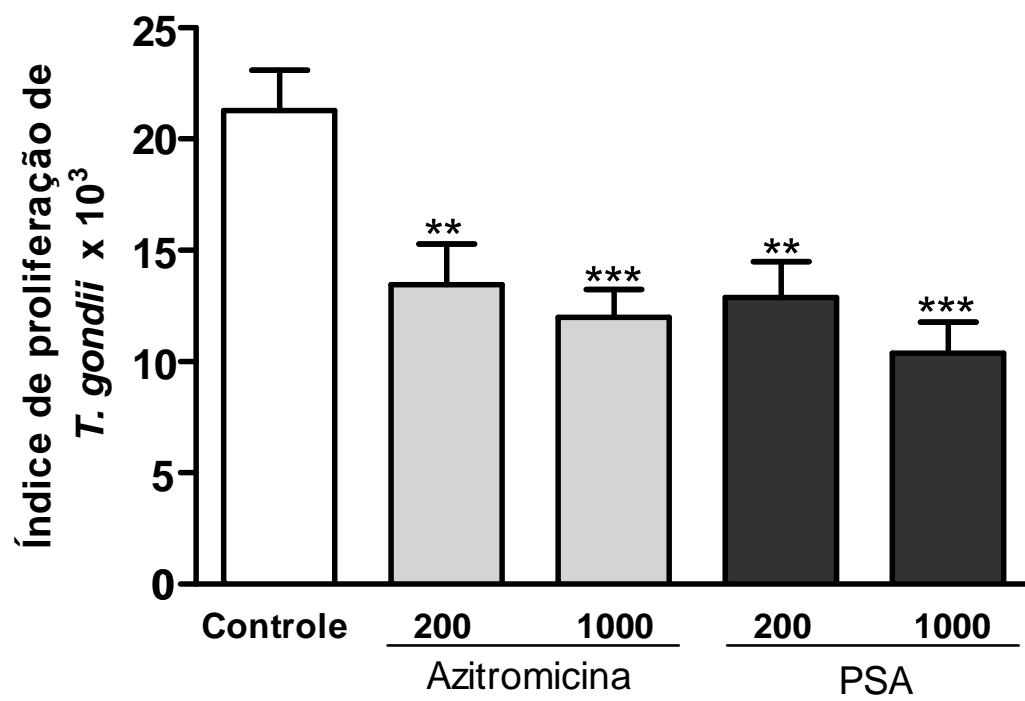


Figura 4: Detecção de *T. gondii* por imuno-histoquímica em vilosidades placentárias. As vilosidades de terceiro trimestre foram coletadas e cultivadas em placas de 96 poços e após 24 horas foram infectadas com 1×10^6 taquizoítas de *T. gondii* /poço. Depois de 72 horas foram tratadas com as azitromicina ou associação de drogas e mantidas por 24 horas em condições de cultura. Em seguida, os vilos foram lavados, fixados, corados com azul de toluidina e analisados em relação à imunomarcação e morfologia. Fotomicrografias representativas de vilos não infectados **(a)**, vilos infectados por *T. gondii* e não tratados **(b)**, vilos infectados e tratados com associação de PSA **(c)** e vilos tratados com azitromicina, ambos na concentração de 1000 µg/mL **(d)**. As setas demonstram a imunomarcação de *T. gondii*. Contra-coloração por hematoxilina de Harris. Barras: 10µm. As imagens foram capturadas pelo fotomicroscópio DM500 (Leica Microsystems, Aotec Instrumentos Científicos, São Paulo, SP, Brasil).

Figura 4

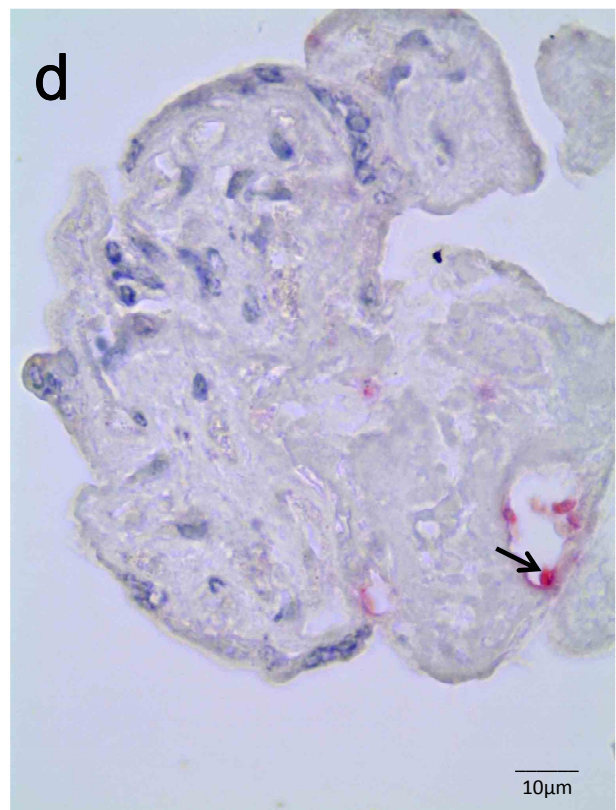
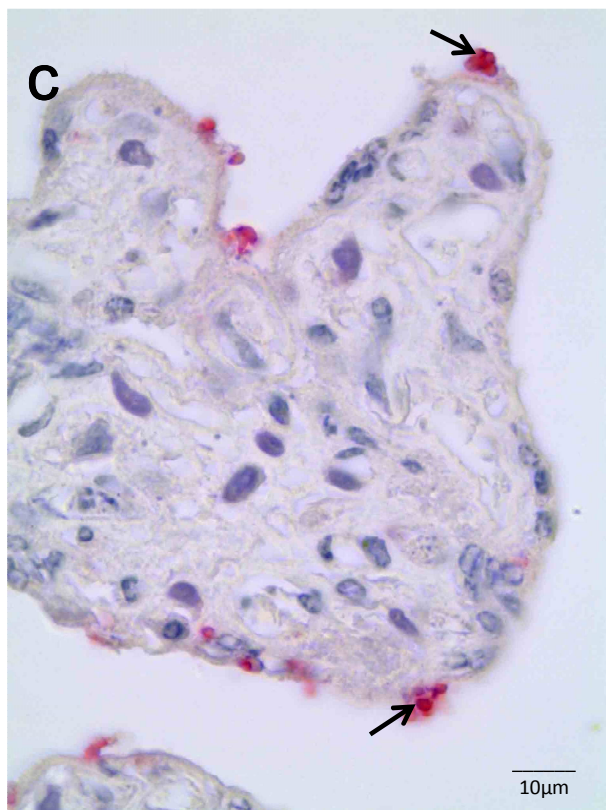
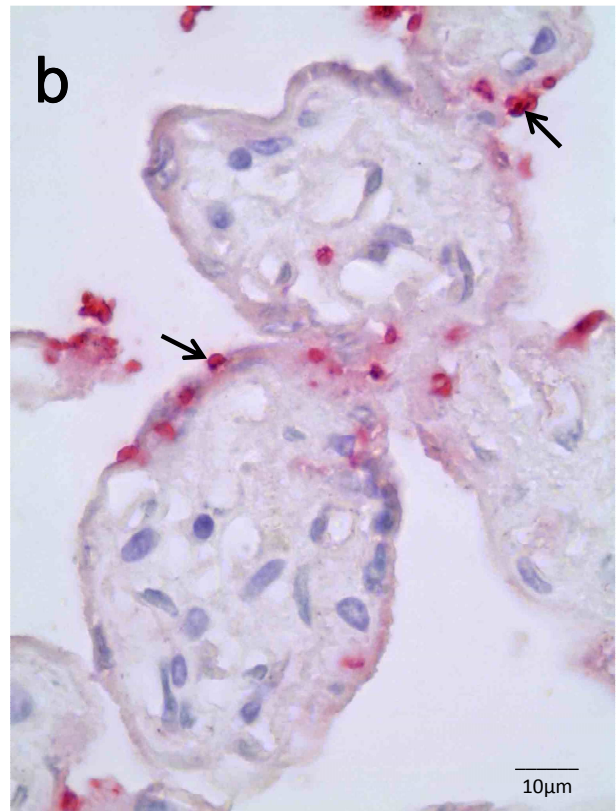
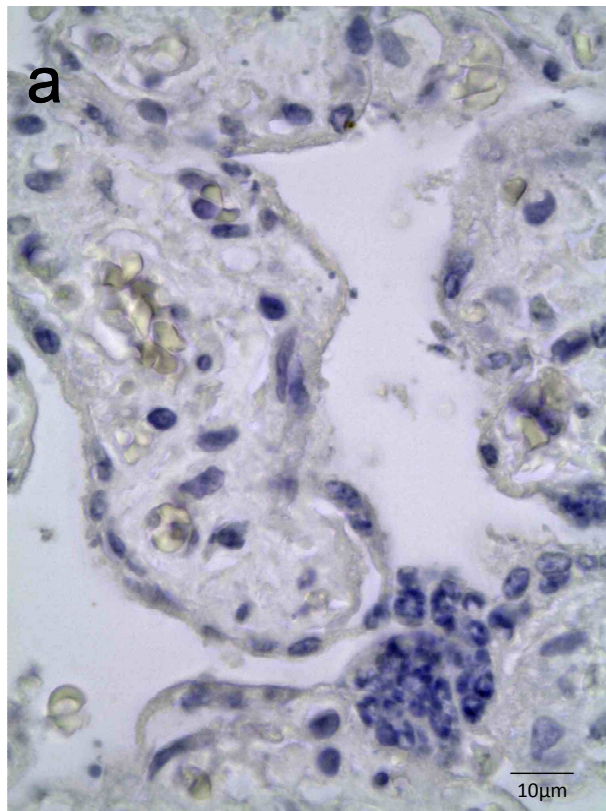


Figura 5: Detecção de citocinas IL-12 (a), TNF- α (b), IL-10 (c) e TGF- β 1 (d) em vilos placentários infectados ou não com *T. gondii* e tratadas com azitromicina ou PSA. Os explantes placentários foram coletados, infectados ou não com *T. gondii* (1×10^6 taquizoítas/poço) e tratados com a azitromicina ou PSA em concentrações de 200 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Os sobrenadantes foram coletados e submetidos à técnica ELISA para detecção das citocinas e normalizados com o total de proteínas, sendo os resultados expressos em pg/mg. A curva (-●-) demonstra a variação da proliferação intracelular de *T. gondii* com relação ao tratamento, correlacionando com a variação na produção de citocinas. (*) Diferença com o controle não infectado. (#) Diferença com o controle infectado. (ϕ) Diferença intergrupos. Todos os dados foram analisados por One-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni e expressos como média \pm SEM de oito experimentos independentes realizados em triplicata. Para três símbolos, $P < 0,001$. Para dois símbolos, $P < 0,01$. Para um símbolo, $P < 0,05$.

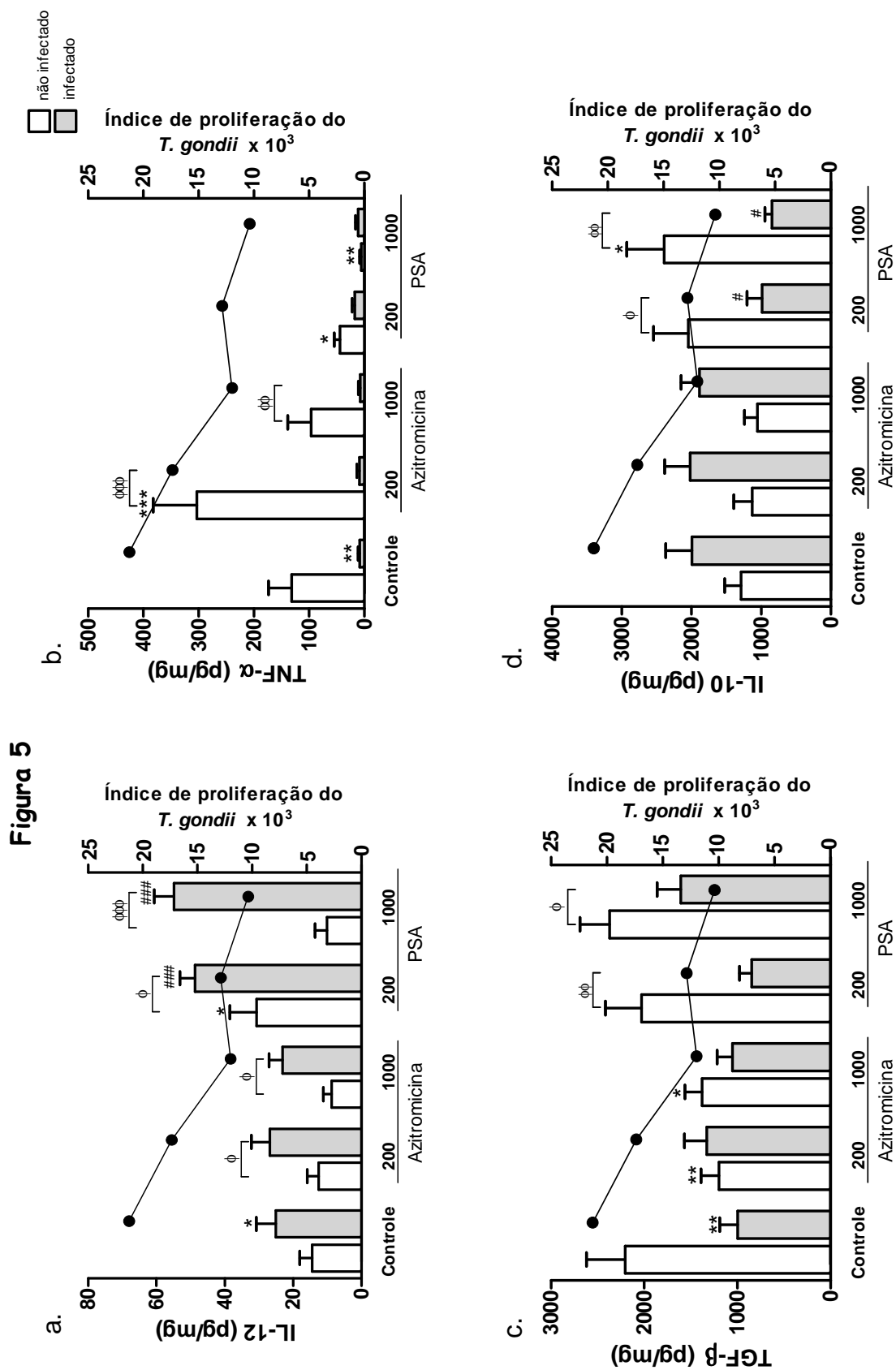


Figura 6: Detecção de citocinas IL-2 (a), IL-6 (b), IFN- γ (c) e IL-17A (d) em explantes placentários infectados ou não com *T. gondii* e tratadas com azitromicina ou PSA. Os vilos foram coletados, infectados ou não com *T. gondii* (1×10^6 taquizoítas/ poço) e tratados com a azitromicina ou PSA em concentrações de 200 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Os sobrenadantes foram coletados e submetidos a análise por técnica CBA para detecção das citocinas e normalizados com o total de proteínas, sendo os resultados expressos em pg/mg. A curva (-●-) demonstra a variação da proliferação intracelular de *T. gondii* em relação ao tratamento e correlacionando com a variação na produção de citocinas. (*) Diferença com o controle não infectado. (#) Diferença com o controle infectado. (ϕ) Diferença intergrupos. Todos os dados foram analisados por One-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni e expressos como média \pm SEM de oito experimentos independentes realizados em triplicata. Para três símbolos, $P < 0,001$. Para dois símbolos, $P < 0,01$. Para um símbolo, $P < 0,05$.

Figura 6

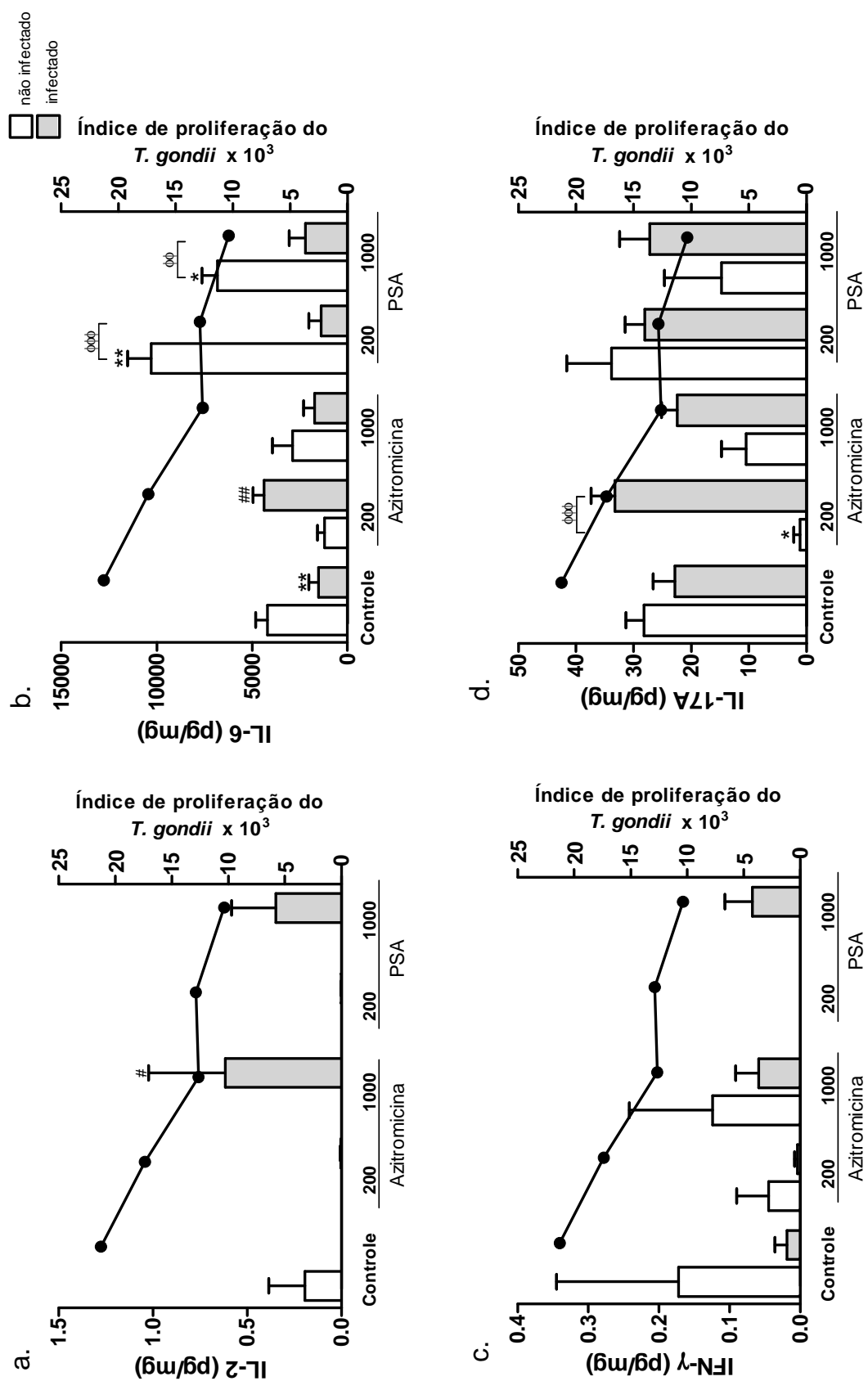


Figura 7: Detecção de hormônios estradiol (a), progesterona (b) e hCG+β (c) em vilos placentários infectados ou não e tratados com azitromicina ou PSA. Os explantes placentários foram coletados, infectados ou não por *T. gondii* (1×10^6 taquizoítas/ poço) e tratados com azitromicina ou PSA em concentrações de 200 e 1000 µg/mL. Os sobrenadantes foram coletados e submetidos a análise por eletroquimioluminescência usando sistema automatizado Cobas E-411, com Kit Roche® para detecção de hormônios. Além disso, foram normalizados com o total de proteínas dos vilos, sendo os resultados expressos em pg/mg, ng/mg e mIU/mg, respectivamente. A curva (-●-) demonstra a variação da proliferação intracelular de *T. gondii* em relação ao tratamento e correlacionando com a variação na produção de hormônios. (*) Diferença com o controle não infectado. (#) Diferença com o controle infectado. (φ) Diferença intergrupos. Todos os dados foram analisados por One-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni e expressos como média ± SEM de oito experimentos independentes realizados em triplicata. Para três símbolos, $P < 0,001$. Para dois símbolos, $P < 0,01$. Para um símbolo, $P < 0,05$.

Figura 7

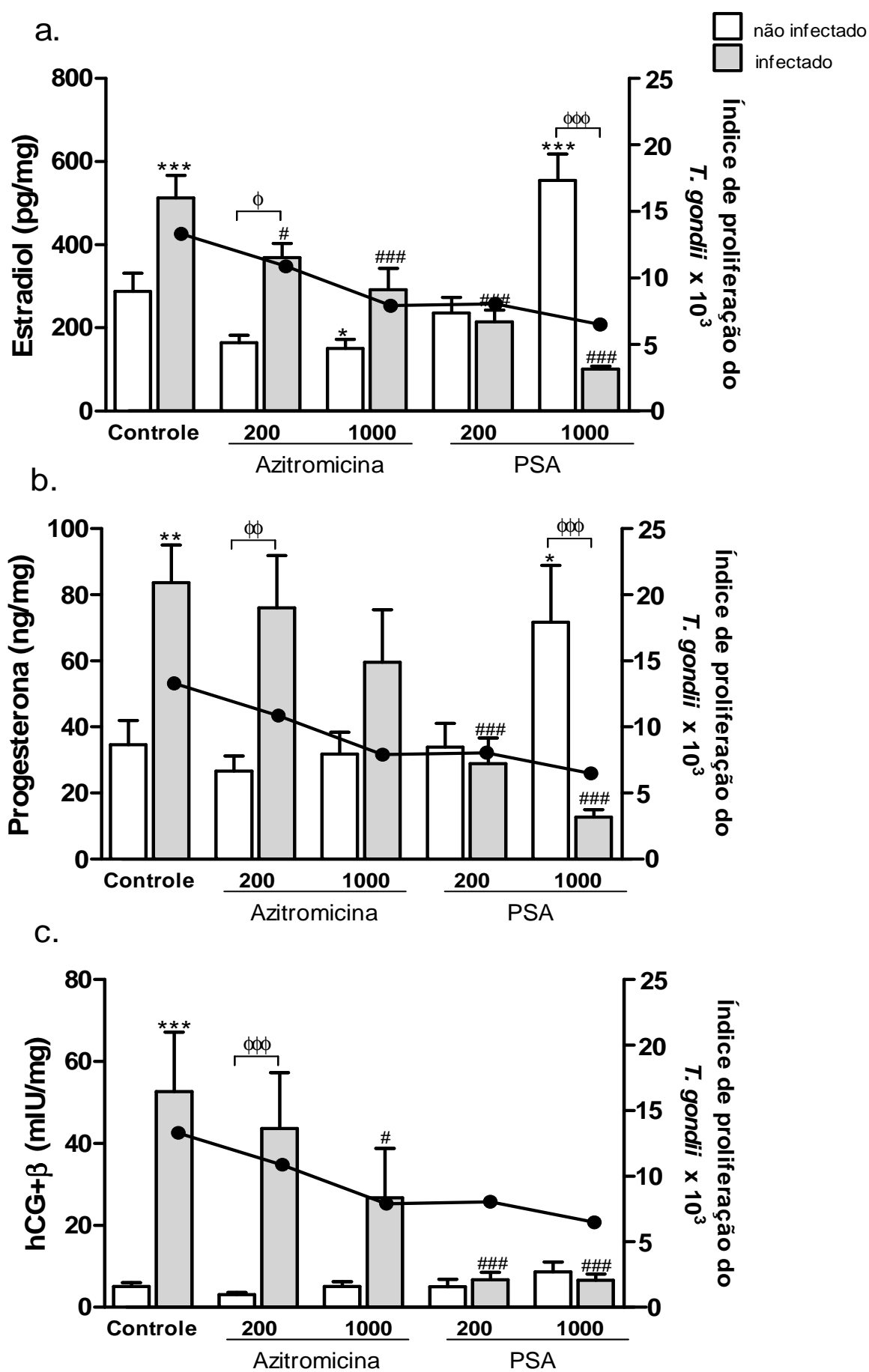
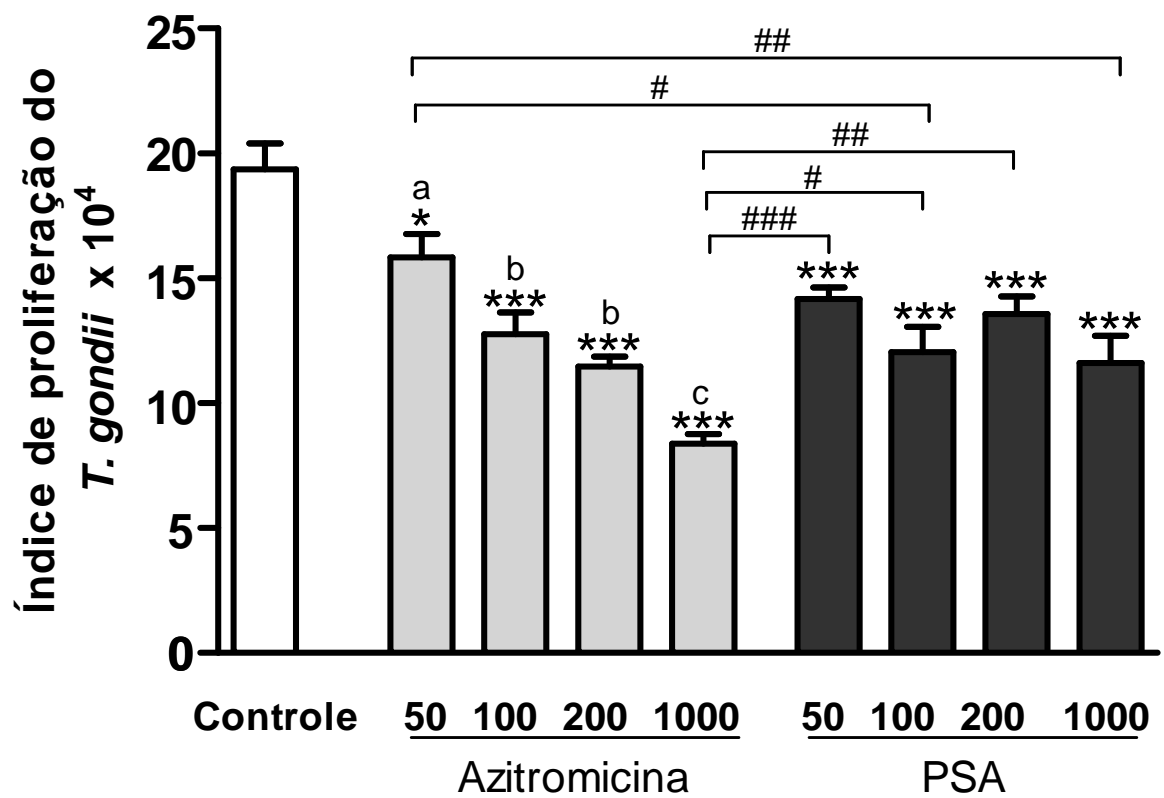


Figura 8: Tratamento prévio de taquizoítas do clone RH 2F1 de *T. gondii* com antibióticos azitromicina ou PSA nas concentrações de 50, 100, 200 e 1000 µg/mL. Taquizoítas do clone RH 2F1 de *T. gondii* (5×10^6) foram coletados e tratados durante 1 hora com diferentes concentrações dos antibióticos em estufa de CO₂ a 37°C. Posteriormente, foram utilizados para infectar os vilos placentários e estes foram mantidos por mais 72 horas em condições de cultura. Os explantes foram então submetidos ao ensaio de proliferação de *T. gondii* através da reação de β-galactosidade, e comparados com os vilos infectados e não tratados. Os dados expressam a média ± SEM representativa de três experimentos independentes em quintuplicata. As múltiplas comparações foram realizadas por One-Way ANOVA com pós teste de Bonferroni. (*) Comparação com o controle infectado não tratado. (#) Comparação entre grupos tratados. (a, b, c, d) Comparação intergrupos. Para três símbolos, $P < 0,001$. Para dois símbolos, $P < 0,01$. Para um símbolo, $P < 0,05$.

Figura 8



CONCLUSÕES

- O tratamento com azitromicina ou PSA não causaram toxicidade significativa nas concentrações de 200 ou 1000 $\mu\text{g/ml}$;
- O tratamento dos vilos placentários humanos com o macrolídeo azitromicina ou PSA são capazes de controlar a infecção e proliferação de *T. gondii*;
- Vilos placentários humanos submetidos aos tratamentos com azitromicina ou associação de fármacos (PSA) não apresentaram alterações morfológicas;
- A azitromicina modula a secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias, estando relacionada com aumento na secreção de $\text{TNF-}\alpha$ e redução de IL-17A por vilos placentários humanos. Na presença de *T. gondii* a azitromicina na concentração de 200 $\mu\text{m/mL}$ induziu maior produção de IL-6 comparado com vilos infectados não tratados, enquanto na concentração de 1000 $\mu\text{m/mL}$ houve maior produção de IL-2;
- Tratamento com PSA aumentou a produção de IL-6 e diminuiu $\text{TNF-}\alpha$, e com a infecção induziu aumento da produção de IL-12 e redução de IL-10;
- *T. gondii* estimulou a secreção de hormônios progesterona, estradiol e $\text{hCG}+\beta$ enquanto que o antibiótico azitromicina regulou negativamente a produção de hormônios e a proliferação do parasito, No tratamento com PSA e durante a infecção por *T. gondii* houve redução na secreção dos três hormônios;
- Não houve detecção de produção de nitrito nos sobrenantes analisados;
- Azitromicina diminuiu a proliferação de *T. gondii*, demonstrando ação microbicida direta do fármaco.

REFERÊNCIAS

- ABOU-BACAR, A. PFAFF, A.W.; GEORGES, S.; LETSCHER-BRU, V.; FILISETTI, D.; VILLARD, O.; ANTONI, E.; KLEIN, J.P.; CANDOLFI, E. Role of NK cells and gamma interferon in transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. **Infect. Immun., United States**, v. 72, p. 1397-401, Mar, 2004.
- ADAMS, K.M.; YAN, Z.; STEVENS, A.M.; NELSON, J.L. The changing maternal “self” hypothesis: A mechanism for maternal tolerance of the fetus. **Placenta.**, London, v. 28, n. 5-6, p. 378-382, May-Jun., 2007.
- AJIOKA, J.W.; FITZPATRICK, J.M.; REITTER, C.P. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. **Expert Rev Mol Med.**, Cambridge, v. 6; p.1-19. Jan., 2001.
- ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature reviews. Immunology**, London, v. 5, n. 2, p.162-170, Feb., 2005.
- BANSAL, A. S.; BORA, S. A.; SASO, S.; SMITH, J. R.; JOHNSON, M. R.; THUM, M. Y. Mechanism of human chorionic gonadotrophin-mediated immunomodulation in pregnancy. **Expert Rev Clin Immunol.**, v. 8, n. 8, p. 747-53, Nov, 2012.
- BARBOSA, B. F; SILVA, D. A. O.; COSTA, I. N.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon- γ , interleukin-10 and transforming growth factor- β 1. **Clin. Exp. Immunol.**, England, v. 151, n. 3, p. 536-545, Mar., 2008.
- BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS.**, Copenhagen, v.117, n.5-6, p.458-76, May, 2009.
- BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon treated mouse macrophages. **Infect. Immun.**, Wurzburg, v. 31, n. 3, p. 1141-1145, Mar., 1993.
- BOSCH-DRIESSEN, L. H.; VERBRAAK, F. D.; SUTTORP-SCHULTEN, M. S.; VAN RUYVEN, R. L.; KLOK, A. M.; HOYNG, C. B.; ROTHOVA, A. A prospective, randomized trial of pyrimethamine and azithromycin vs pyrimethamine and sulfadiazine for the treatment of ocular toxoplasmosis. **Am J Ophthalmol**, v.134, n. 1, p.34-40, Jul., 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 7, n. 72, p. 248-254, May., 1976.

BRAZ, L. M. A.; DI PIETRO, A. O.; AMATO NETO, V.; FRANÇA, F. O. S. Avaliação da eficácia da azitromicina e da pirimetamina, usadas isolada ou associadamente, no tratamento de infecção experimental de camundongos pelo *Toxoplasma gondii*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasil, v. 32, n. 4, p. 401-403, Jul-Aug., 1999.

BRISSON-NOËL, A.; TRIEU-CUOT, P.; COURVALIN, P. Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. **J Antimicrob Chemother.**, London, v.22, Suppl B, p. 13-23, Jul., 1988.

BUTCHER, B. A.; KIM, L.; PANAPOULOS, A. D.; WATOWICH, S. S.; MURRAY, P. J.; DENKERS, E. Y. Cutting Edge: IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF- α in host macrophages. **J. Immunol.**, Nova York, v. 174, n. 6, p. 3148-3152, Mar., 2005.

BUTCHER, B.A.; DENKERS, E.Y. Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. **Infect Immun.**, New York, v.70, n.9, p.5216-24, Sep., 2002.

CANIGGIA, I.; LYE, S.J.; CROSS, J.C. Activin is a local regulatory of human cytotrophoblast cell differentiation. **Endocrinology**, United States, v. 138, n. 9, p. 3976-3986, 1997.

CARDAROPOLI, S.; PAULESU, L.; ROMAGNOLI, R.; IETTA, F.; MARZIONI, D.; CASTELLUCCI, M.; ROLFO, A.; VASARIO, E.; PICCOLI, E.; TODROS, T. Macrophage migration inhibitory factor in fetoplacental tissues from preeclamptic pregnancies with or without fetal growth restriction. **Clin Dev Immunol.**, Egypt, v. 2012, p. 639342, 2012.

CHÊNE. G.; THIÉBAUT, R. Options for clinical trials of pre and post-natal treatments for congenital toxoplasmosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v.104, n.2, p.299-304, Mar, 2009.

CHICO, R.M.; CHANDRAMOHAN, D. Azithromycin plus chloroquine: combination therapy for protection against malaria and sexually transmitted infections in pregnancy. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.**, London, v.7, n.9, p.1153-67, Sep, 2011.

CHICO, R.M.; PITTROF, R.; GREENWOOD, B.; CHANDRAMOHAN, D. Azithromycin-chloroquine and the intermittent preventive treatment of malaria in pregnancy. **Malar J.**, London, v.16, p. 7:255, Dec., 2008.

COLLAZO, C. M.; YAP, G. S.; SEMPOWSKI, G. D.; LUSBY, K. C.; TESSAROLLO, L.; WOUDE, G. F.; SHER, A. TAYLOR, G. A. Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential pathogen-specific roles in resistance to infection. **J. Exp. Med.**, Bethesda, v. 194, n. 2, p.181-188, Jul., 2001.

CORTINA-BORJA, M.; TAN, H.K.; WALLON, M.; PAUL, M.; PRUSA, A.; BUFFOLANO, W.; MALM, G.; SALT, A.; FREEMAN, K.; PETERSEN, E.; GILBERT, R.E.; European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (EMSCOT). Prenatal treatment for serious neurological sequelae of congenital toxoplasmosis: an observational prospective cohort study. **PLoS Med.**, v.10, p. 12-7, Oct, 2010.

COSTA, I. N.; ANGELONI, M. B.; SANTANA, L. A.; BARBOSA, B. F.; SILVA, M. C.; RODRIGUES, A. A.; ROSTKOWSA, C.; MAGALHÃES, P. M.; PENA, J. D.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. Azithromycin inhibits vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). **Placenta**, London, v. 30, p. 884-90, Oct, 2009.

COUTINHO, L.B.; GOMES, A. O.; ARAÚJO, E. C.; BARENCO, P. V.; SANTOS, J. L.; CAIXETA, D. R.; SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; FERRO, E. A.; SILVA, N. M. The impaired pregnancy outcome in murine congenital toxoplasmosis is associated with a pro-inflammatory immune response, but not correlated with decidual inducible nitric oxide synthase expression. **Int J Parasitol.**, v. 42, p.341-52. Apr, 2012.

CROME, S. Q.; WANG, A. Y.; LEVINGS, M. K. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. **Clin Exp Immunol.**, v.159, n. 2, p.109-19, Feb, 2012.

CUTOLO, M.; SULLI, A.; VILLAGGIO, B.; SERIOLO, B.; ACCARDO, S. Relations between steroid hormones and cytokines in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis. England**; England, v. 57, n. 10, p. 573-577, Oct, 1998.

DA SILVA, R. C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. *Parasitol Res.*, São Paulo, v. 105, n. 4, p. 893-898. Oct., 2009.

DAHER, S.; DE ARRUDA GERALDES DENARDI, K.; BLOTTA, M.H.; MAMONI, R.L.; RECK, A.P.; CAMANO, L.; MATTAR, R. Cytokines in recurrent pregnancy loss. **J Reprod Immunology**, Ireland, v. 62, n. 1-2, p. 151-157. Jun, 2004.

DAHL, E. L.; ROSENTHAL, P. J. Apicoplast translation, transcription and genome replication: targets for antimalarial antibiotics. **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 6, p. 279-84, Jun, 2008.

DEALTRY G. B.; O'FARRELL M. K.; FERNANDEZ N. The Th2 cytokine environment of the placenta. **Int Arch Allergy Immunol.** Switzerland, v.123, n. 2, p.107-119, Oct, 2000.

DENKERS, E.Y. Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*. **J Biomed Biotechnol.**, v. 2010, p.737125, Nov, 2010.

DENNEY, J. M.; NELSON, E. L.; WADHWA, P. D.; WATERS, T. P.; MATHEW, L.; CHUNG, E. K.; GOLDENBERG, R. L.; CULHANE, J. F. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. **Cytokine**, Philadelphia, v. 53, n. 2, p. 170-177, Feb., 2010.

DEROCHER, A. E.; KARNATAKI, A.; VANEY, P.; PARSONS, M. Apicoplast targeting of a *Toxoplasma gondii* transmembrane protein requires a cytosolic tyrosine-based motif. **Traffic.**, Seattle, v. 13, n. 5, p. 694-704, May, 2012.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin. Microbiol. Rev.**, Beltsville, v. 11, nº 2, p. 267-299. Apr., 1998.

DUMÈTRE, A.; LE BRAS, C.; BAFFET, M.; MENECEUR, P.; DUBEY, J. P.; DEROUIN, F.; DUGUET, J. P.; JOYEUX, M.; MOULIN, L. Effects of ozone and

ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 153, n. 3-4, p. 209-213, May, 2008.

DUNAY, I. R.; SIBLEY, L. D. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. **Curr. Opin. Immunol.**, Freiburg, v. 22, n° 4, p.461-466, Aug., 2010.

DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Semin Immunopathol.**, v. 34, n. 6, p.793-813, Nov, 2012.

ELMORE, S. A.; JONES, J. L.; CONRAD, P. A.; PATTON, S.; LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. **Trends Parasitol.**, Colorado, v. 26, n. 4, p. 190-6, Apr, 2010.

ELSHEIKHA, H. M. Congenital Toxoplasmosis: Priorities for further health promotion action. **Public Health**, Nottingham, v. 122, n. 4, p.335-53, Apr, 2008.

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **J. Comp. Path.** England, v. 126, n. 2-3, p. 79-94, Feb/Apr, 2002.

FERGUSON, D. J.; HENRIQUEZ, F. L.; KIRISITS, M. J.; MUENCH, S. P.; PRIGGE, S. T.; RICE, D. W.; ROBERTS, C. W.; MCLEOD, R. L. Maternal inheritance and stage-specific variation of the apicoplast in *Toxoplasma gondii* during development in the intermediate and definitive host. **Eukaryot Cell.**, United Kingdom, v. 4, n. 4, p. 814-26, Apr, 2005.

FERRO, E.A.; MINEO, J.R.; IETTA, F.; BECHI, N.; ROMAGNOLI, R.; SILVA, D.A.; SORDA, G.; BEVILACQUA, E.; PAULESU, L.R. Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. **Am J Pathol.**, United States, v. 172, n. 1, p. 50-8, Jan, 2008.

FICHERA, M. E.; ROOS, D. S. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. **Nature.**, Pennsylvania, v. 390, n. 6658, p.407-9, Nov, 1997.

FICHERA, M. E.; ROOS, D. S. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. **Nature.**, England, v. 390, n. 6658, p. 407-9, Nov, 1997.

FLECKENSTEIN, M. C.; REESE, M. L.; KÖNEN-WAISMAN, S.; BOOTHROYD, J. C.; HOWARD, J. C.; STEINFELDT, T. A *Toxoplasma gondii* pseudokinase inhibits host IRG resistance proteins. **PLoS Biol.**, Germany, v. 10, n. 7, p. e1001358, 2012.

FRANCO, P. S.; GOMES, A. O.; BARBOSA, B. F.; ANGELONI, M. B.; SILVA, N. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. **Placenta**, London, v. 32, n° 11, p. 838-844, Nov., 2011.

FRIEDLANDER, A. L.; ALBERT, R. K. Chronic macrolide therapy in inflammatory airways diseases. **Chest**, Chicago, v. 138, n. 5, p. 1202-12, Nov, 2010.

GRAS, L.; WALLON, M.; POLLAK, A.; CORTINA-BORJA, M.; EVENGARD, B.; HAYDE, M.; PETERSEN, E.; GILBERT, R.; European Multicenter Study on

Congenital Toxoplasmosis. Association between prenatal treatment and clinical manifestations of congenital toxoplasmosis in infancy: a cohort study in 13 European centres. **Acta Paediatr.**, v. 94, n. 12, p. 1721-31, Dec, 2005.

GRUJIC, J.; DJURKOVIC-DJAKOVIC, O.; NIKOLIC, A.; KLUN, I.; BOBIC, B. Effectiveness of spiramycin in murine models of acute and chronic toxoplasmosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 226–230, Mar., 2004.

HE, C. Y.; SHAW, M. K.; PLETCHER, C. H.; STRIEPEN, B.; TILNEY, L. G.; ROOS, D. S. A plastid segregation defect in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **EMBO J.**, England, v. 20, n. 3, p.330-9, Feb, 2001.

HENRY, L.; BEVERLEY, K. A. Age and sex differences in the response of lymph node post-capillary venules in mice infected with *Toxoplasma gondii*. **Br J Exp Pathol.**, England, v. 57, n. 3, p.274-80, Jun, 1976.

HERNANDEZ-DIAZ, S.; WERLER, M. M.; WALKER, A. M.; MITCHELL, A. A. Neural tube defects in relation to use of folic acid antagonists during pregnancy. **Am J Epidemiol**, v. 15; n. 153, p. 961-8, May, 2001.

HIGA, L. T.; ARAÚJO, S. M.; TSUNETO, L.; CASTILHO-PELLOSO, M.; GARCIA, J. L.; SANTANA, R. G.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. A prospective study of Toxoplasma-positive pregnant women in southern Brazil: a health alert. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, Brasil, v. 104, n. 6, p. 400-5, Jun, 2010.

JONES, L.A.; KREEM, S.; SHWEASH, M.; PAUL, A.; ALEXANDER, J.; ROBERTS, C.W. Differential modulation of TLR3- and TLR4-mediated dendritic cell maturation and function by progesterone. **J. Immunol.**, United States ,v. 185, n.8, p. 4525–4534, Oct, 2010.

KATZUNG, B. C. **Farmacologia Básica & Clínica**, 9ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 546-54, 2006.

KELLY, M. N.; KOLLS, J. K.; HAPPEL, K.; SCHWARTZMAN, J. D.; SCHWARZENBERGER, P.; COMBE, C.; MORETTO, M.; KHAN, I. A. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. **Infect Immun**, v. 73, n. 1, p. 617–621, Jan, 2005.

KITTAS, C.; HENRY, L. Effect of gonadectomy and oestrogen administration on the response of lymph-node post-capillary venules to infection with *Toxoplasma gondii*. **J Pathol.**, England, v. 127, n. 3, p.129-36, Mar, 1979.

KITTAS, C.; HENRY, L., Effect of sex hormones on the response of mice to infection with *Toxoplasma gondii*. **Br. J. Exp. Pathol.**, United States, n. 61, n.6, p. 590–600, Dec, 1980.

KODJIKIAN, L. *Toxoplasma* and pregnancy. **Journal Français D’Ophtamologie**, French, v. 33, n. 5, p. 362-367, May, 2010.

KÖRNER, H.; MCMORRAN, B.; SCHLÜTER, D.; FROMM, P. The role of TNF in parasitic diseases: still more questions than answers. **Int J Parasitol.**, Australia, v. 40, n. 8, p. 879-88, Jul, 2010.

KOTRESHA, D.; NOORDIN, R. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 118, n. 8, p. 529-542, Aug., 2010.

KRISHNAN, L.; GUILBERT, L. J.; RUSSELL, A. S.; WEGMANN, T. G.; MOSMANN, T. R.; BELOSEVIC, M. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. **J. Immunol.**, United States, v. 156, n. 2, p. 644- 652, 1996.

KUL, O.; YILDIZ, K.; OCAL, N.; FREYRE, A.; DENIZ, A.; KARAHAN, S.; ATMACA, H. T.; GOKPINAR, S.; DINCEL, G. C.; UZUNALIOĞLU, T.; TERZI, O. S. In-vivo efficacy of toltrazuril on experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in lambs: A novel strategy for prevention of human exposure to meat-borne toxoplasmosis. **Res Vet Sci.**, Sep, 2012. [Epub ahead of print]

LANG, C.; GROB, U.; CARSTEN, G. K. L. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Res.** Germany, v. 100, n. 2, p. 191-203, Jan, 2007.

LANG, R.; PATEL, D.; MORRIS, J. J.; RUTSCHMAN, R. L.; MURRAY, P. J. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. **J Immunol.**; Memphis, v. 169, n. 5, p. 2253–63, Sep, 2002.

LEE, T. P.; CHIANG, B. L. Sex differences in spontaneous versus induced animal models of autoimmunity. **Autoimmun Rev.** Taiwan, v. 11, n. 6-7, p.A422-9, May, 2012.

LESCANO, S. A.; AMATO NETO, V.; CHIEFFI, P. P.; BEZERRA, R. C.; GAKIYA, E.; FERREIRA, C. S.; BRAZ, L. M. Evaluation of the efficacy of azithromycin and pyrimethamine, for treatment of experimental infection of mice with *Toxoplasma gondii* cystogenic strain. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Brasil, v. 37, n. 6, p. 460-2, Nov-Dec, 2004.

LI, Y.; MATSUZAKI, N.; MASUHIRO, K.; KAMEDA, T.; TANIGUCHI, T.; SAJI, F.; TANIZAWA, O. Trophoblast-derived tumor necrosis factor-alpha induces release of human chorionic gonadotropin using interleukin-6 (IL-6) and IL-6-receptor-dependent system in the normal human trophoblasts. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Yonago, v. 74, n. 1, p. 184-191, Jan., 1992.

LINDSAY, D. S.; RIPPEY, N. S.; COLE, R. A.; PARSONS, L. C.; DUBEY, J. P.; TIDWELL, R. R.; BLAGBURN, B. L. Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells. **Am J Vet Res.**, Auburn, v. 55, n. 7, p.976-81, Jul, 1994.

LOPES, C. D.; SILVA, N. M.; FERRO, E. A.; SOUSA, R. A.; FIRMINOT, M. L.; BERNARDES, E. S.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; PENA, J. D. Azithromycin reduces ocular infection during congenital transmission of toxoplasmosis in the *Calomys callosus* model. **J Parasitol.**, Uberlândia, v. 95, p. 1005-10, Aug, 2009.

LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Effect of pregnancy on resistance to *Listeria monocytogenes* and *Toxoplasma gondii* infections in mice. **Infect Immun.**, United States, v. 38, n. 3, p.1164-71, Dec, 1982.

LUJÁN, C.D. TRIQUELL, M.F.; SEMBAJ, A.; GUERRERO, C.E.; FRETES, R.E. Trypanosoma cruzi: productive infection is not allowed by chorionic villous explant from normal human placenta in vitro. **Exp Parasitol.**, United States, v. 108, 3-4, p.176-81, Nov-Dec, 2004

LUPPI, P. How immune mechanisms are affected by pregnancy. **Vaccine.**, Netherlands, v. 21, n. 24, p. 3352-3357, Jul, 2003.

MAEDA, Y.; OHTSUKA, H.; TOMIOKA, M.; OIKAWA, M. Effect of progesterone on Th1/Th2/Th17 and Regulatory T cell-related genes in peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in cows. **Vet Res Commun.**, Nov, 2012. [Epub ahead of print]

MANKIN, A. S. Macrolide myths. **Curr Opin Microbiol.**, London, v. 11, n. 5, p. 414-421, Oct., 2008.

MARTINS-DUARTE, E. S.; LEMGRUBER, L.; LORENTE, S. O.; GROS, L.; MAGARACI, F.; GILBERT, I. H.; DE SOUZA, W.; VOMMARO, R. C. Evaluation of three novel azasterols against *Toxoplasma gondii*. **Vet Parasitol.**, Netherlands, v.177, n. 1-2, p.157-61, Apr, 2011.

MCFADDEN, D. C.; SEEGER, F.; BOOTHROYD, J. C. Use of *Toxoplasma gondii* expressing beta-galactosidase for colorimetric assessment of drug activity in vitro. . **Antimicrob Agents Chemother.**, v.41, p. 1849-53, Sep, 1997.

MCFADDEN, G. I.; ROOS, D. S. Apicomplexan plastids as drug targets. **Trends Microbiol.**, v. 7, n. 8, p.328-33, Aug, 1999.

MEISSER, A.; CAMEO, P.; ISLAMI, D.; CAMPANA, A.; BISCHOF, P. Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. **Mol. Hum. Reprod.**, Geneva, v. 5, n. 11, p. 1055-1058, Nov., 1999.

MENDELSON, C. R. MiniReview: Fetal-Maternal hormonal signaling in pregnancy and labor. **Mol Endocrinol. Mol Endocrinol.**, England, v. 23, n. 7, p.947-54, Jul, 2009.

MENENDEZ, C. Malaria during pregnancy: a priority area of malaria research and control. **Parasitol Today.**, England, v.11, n. 5, p. 178-83, May, 1995.

Menzies, F. M.; Henriquez, F. L.; Roberts, C. W. Immunological control of congenital toxoplasmosis in the murine model. **Immunol Lett.**, Glasgow, v. 115, n. 2, p. 83-9, Jan, 2008.

MILLER, C. M.; BOULTER, N. R.; IKIN, R. J.; SMITH, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**, Australia, v. 39, n. 1, p. 23-39, 2009.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**; Bethesda, v.27, n. 2, p. 283-287, Feb., 1980.

- MIYAURA, H.; IWATA, M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. **J Immunol**, United States, v. 168, n. 3, p. 1087-1094, 2002.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, Stanford, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, Jun., 2004.
- MONTOYA, J.G.; REMINGTON, J.S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical Infectious Disease**, United States, v. 47, n. 4, p. 554-566, Aug, 2008.
- MOZZATTO, L.; PROCIANOY, R.S. Incidence of congenital toxoplasmosis in Southern Brazil: a prospective study. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.**, v. 45, n. 3, p. 147-51, May-Jun, 2003.
- MÜLLER, J.; HEMPHILL, A. Drug target identification in intracellular and extracellular protozoan parasites. **Curr Top Med Chem.**, Switzerland, v.11, n. 16, p.2029-38, 2011.
- MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunol Rev.**, v. 240, n. 1, p. 269-85, Mar, 2011.
- OLIVEIRA, J.G.; SILVA, N.M.; SANTOS, A.A.; SOUZA, M.A.; FERREIRA, G.L.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. BeWo Trophoblasts are Unable to Control Replication of *Toxoplasma gondii*, even in the Presence of Exogenous IFN-gamma. **Placenta.**, London, v. 27, n° 6-7, p. 691-698, Jun-Jul, 2006.
- OLIVEIRA-SILVA, F.; MORAIS-TEIXEIRA, E.; RABELLO, A. Antileishmanial activity of azithromycin against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 78, n. 5, p.745-9, May, 2008.
- ORESHKOVA, T.; DIMITROV, R.; MOURDJEVA, M. A cross-talk of decidual stromal cells, trophoblast, and immune cells: a prerequisite for the success of pregnancy. **Am J Reprod Immunol.**, Denmark, v. 68, n.5, p. 366-73, Nov, 2012.
- OSTENSEN, M. Sex hormone and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Ann. NY Acad. Sci.**, United States, v. 876, p. 131, Jun, 1999.
- PEREIRA, M. R.; HENRICH, P. P.; SIDHU, A. B.; JOHNSON, D.; HARDINK, J.; VAN DEUSEN, J.; LIN, J.; GORE, K.; O'BRIEN, C.; WELE, M.; DJIMDE, A.; CHANDRA, R.; FIDOCK, D. A. In vivo and in vitro antimalarial properties of azithromycin-chloroquine combinations that include the resistance reversal agent amlodipine. **Antimicrob Agents Chemother**, New York, v. 55, p.3115-24, Jul, 2011.
- PETROPOULOS, A. D.; KOUVELA, E. C.; STAROSTA, A. L.; WILSON, D. N.; DINOS, G. P.; KALPAXIS, D. L. Time-resolved binding of azithromycin to *Escherichia coli* ribosomes. **Journal Molecular Biology**, New York, v. 385, n. 4, p. 1179-1192, Jan., 2009.
- PFAFF, A.W.; MOUSLI, M.; SÉNÉGAS, A.; MARCELLIN, L.; TAKIKAWA, O.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI, E. Impact of foetus and mother on IFN-gamma-induced indoleamine 2,3-dioxygenase and inducible nitric oxide synthase expression in murine

placenta following *Toxoplasma gondii* infection. **Int J Parasitol.**, England, v. 38, n. 2, p. 249-58, Feb, 2008.

PFAFF, A.W.; VILLARD, O.; KLEIN, J.P.; MOUSLI, M.; CANDOLFI, E. Regulation of *Toxoplasma gondii* multiplication in BeWo trophoblast cells: crossregulation of nitric production and polyamine biosynthesis. **Int J Parasitol.**, England, v. 35, p. 1569-76, Aug, 2005.

RAHUMATULLAH A, KHOO BY, NOORDIN R. Triplex PCR using new primers for the detection of *Toxoplasma gondii*. **Exp Parasitol.**, United States, v. 131, p. 231-8, Jun, 2012.

RAJU M, SALAZAR JC, LEOPOLD H, KRAUSE PJ. Atovaquone and azithromycin treatment for babesiosis in an infant. **Pediatr Infect Dis J.**, Connecticut, v. 26, n. 2, p.181-3, Feb, 2007.

RANGO, V.U. Fetal tolerance in human pregnancy—A crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. **Immunology Letters.**, Netherlands, v. 115, n. 1, p.21-32, Jan 2008.

REMINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTES, G. Toxoplasmosis. In: REMINGTON, J. S.; KLEIN, O. J. editores. **Infection diseases of the fetus and newborn infant**. 5^o ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. p. 205-356.

RETSEMA, J.; FU, W. **Macrolides: structures and microbial targets**. **Int J Antimicrob Agents**. 2001;18 Suppl 1:S3-10.

ROBBINS, J. R.; ZELDOVICH, V. B.; POUKCHANSKI, A.; BOOTHROYD, J. C.; BAKARDJIEV, A. I. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun.**, United States, v. 80, n. 1, p.418-28, Jan, 2012.

ROBINSON, D. P.; KLEIN, S. L. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. **Horm Behav.**; v. 62, n. 3, p. 263-71, Aug, 2012.

RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, Quebec, v. 21, n. 4, p. 458-472, May, 2006.

RUBIN, B. K. Immunomodulatory properties of macrolides: overview and historical perspective. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 117, Suppl. 2S-4S, Nov., 2004.

RUBINSTEIN, E.; KELLER, N. Spiramycin renaissance. **J Antimicrob Chemother.**, London, v. 42, n. 5, p. 572-576, Nov., 1998.

SALMAN, S.; ROGERSON, S. J.; KOSE, K.; GRIFFIN, S.; GOMORAI, S.; BAIWOG, F.; WINMAI, J.; KANDAI, J.; KARUNAJEEWA, H. A.; O'HALLORAN, S. J.; SIBA, P.; ILETT, K. F.; MUELLER, I.; DAVIS, T. M. Pharmacokinetic properties of azithromycin in pregnancy. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 54, p. 360-6, Jan, 2010.

SANECKA, A.; FRICKEL, E. M. Use and abuse of dendritic cells by *Toxoplasma gondii*. **Virulence.**, v. 3, n. 7, Nov, 2012. [Epub ahead of print]

Schmidt, S. K.; Siepmann, S.; Kuhlmann, K.; Meyer, H. E.; Metzger, S.; Pudelko, S.; Leineweber, M.; Däubener, W. Influence of tryptophan contained in 1-methyl-tryptophan on antimicrobial and immunoregulatory functions of indoleamine 2,3-dioxygenase. **PLoS One.**, Germany, v. 7, n. 9, p.e44797, 2012.

SCHUMACHER, A.; BRACHWITZ, N.; SOHR, S.; ENGELAND, K.; LANGWISCH, S.; DOLAPTCHIEVA, M.; ALEXANDER, T.; TARAN, A.; MALFERTHEINER, S. F.; COSTA, S. D.; ZIMMERMANN, G.; NITSCHKE, C.; VOLK, H. D.; ALEXANDER, H.; GUNZER, M.; ZENCLUSSEN, A. C. Human chorionic gonadotropin attracts regulatory T cells into the fetal-maternal interface during early human pregnancy. **J Immunol.**, United States, v. 182, n. 9, p. 5488-97, May, 2009.

SIDHU, A. B.; SUN, Q.; NKRUMAH, L. J.; DUNNE, M. W.; SACCHETTINI, J. C.; FIDOCK, D. A. In vitro efficacy, resistance selection, and structural modeling studies implicate the malarial parasite apicoplast as the target of azithromycin. **J Biol Chem.**, v. 282, n. 4, p. 2494-504, Jan, 2007,

SILVA, N. M.; RODRIGUES, C. V.; SANTORO, M. M.; REIS, L. F. L.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; GAZZINELLI, R. T. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. **Infect. Immun.**, Belo Horizonte, v. 70, n. 2, p. 859-868, Feb., 2002.

SILVA-SEGUNDO, G.R.S. Incidência de toxoplasmose congênita em hospitais público e privado- Uberlândia, 2002 (Dissertação de mestrado, Instituto de Ciências

Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia – MG). SINAGRA, A.; LUNA, C.; ABRAHAM, D.; IANNELLA MDEL, C.; RIARTE, A.; KROLEWIECKI, A. J. The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster model. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 6, p. 627-630, Nov-Dec., 2007.

SRIVASTAVA, P.; BHENGRAJ, A. R.; JHA, H. C.; VARDHAN, H.; JHA, R.; SINGH, L. C.; SALHAN, S.; MITTAL, A. Differing effects of azithromycin and doxycycline on cytokines in cells from Chlamydia trachomatis-infected women. **DNA Cell Biol.**, v. 31, n. 3, p. 392-401, Mar, 2012.

STAFFORD, J. J.; NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M. Macrophage mediated innate host defense against protozoan parasites. **Crit Rev Microbiol.**, Edmonton, v. 28, n.3, p.187-248, 2002.

SUBAUSTE, C. S.; KONIARIS, A. H.; REMINGTON, J. S. Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii* infected cells. **J. Immunol.**, Palo Alto, v. 147, n. 11, p. 3955-3959, Dec., 1991.

TAMARU, S.; KIKUCHI, A.; TAKAGI, K.; WAKAMATSU, M.; HORIKOSHI, T.; OGISO, Y. Fetal therapy of severe symptomatic toxoplasmosis using azithromycin. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 37, n. 7, p. 953-7, Jul., 2011.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol.**, England, v. 30, n. 12-13, p.1217-58, Nov. 2000.

TEO, C. F.; ZHOU, X. W.; BOGYO, M.; CARRUTHERS, V. B. Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Baltimore, v. 51, n. 2, p. 679-688, Feb., 2007.

TORKILDSEN, G.; TERRENCE, P.; OBRIEN, P. Conjunctival tissue pharmacokinetic properties of topical azithromycin 1% and moxifloxacin 0.5% ophthalmic solutions: a single-dose, randomized, open-label, active-controlled trial in healthy adult volunteers. **Clin Ther.**, United States, v. 30, n. 11, p. 2005-14, Nov, 2008.

TSAMPALAS, M.; GRIDELET, V.; BERNDT, S.; FOIDART, J. M.; GEENEN, V.; PERRIER D'HAUTERIVE, S. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. **J Reprod Immunol.**, Liege, v. 85, n.1, p. 93-8, May, 2010.

TSUKIHARA, S.; HARADA, T.; DEURA, I.; MITSUNARI, M.; YOSHIDA, S.; IWABE, T.; TERAOKA, N. Interleukin-1 β -induced expression of IL-6 and production of human chorionic gonadotropin in human trophoblast cells via nuclear factor- κ B activation. **Am. J. Reprod. Immunol.**, Yonago, v. 52, n. 3, p. 218-223, Sep., 2004.

UCHIDE, N.; OHYAMA, K.; BESSHO, T.; TAKEICHI, M.; TOYODA, H. Possible roles of proinflammatory and chemoattractive cytokines produced by human fetal membrane cells in the pathology of adverse pregnancy outcomes associated with influenza virus infection. **Mediators Inflamm.** v. 2012, p. 270670, Jul, 2012.

VAIDYA, S. S.; WALSH, S. W.; GERK, P. M. Application of human placental villous tissue explants to study ABC transporter mediated efflux of 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione. **Curr Pharm Biotechnol.**, Netherlands, v. 12, n. 5, p.814-23, May, 2011.

VARGAS-VILLAVICENCIO, J. A.; DE LEÓN-NAVA, M. A.; MORALES-MONTOR, J. Immunoendocrine mechanisms associated with resistance or susceptibility to parasitic diseases during pregnancy. **Neuroimmunomodulation**, Switzerland, v. 16, n. 2, p. 114-21, Feb., 2009.

VIJAYALAXMI, K. K.; VISHALAKSHI, M. Evaluation of the genotoxic effects of pyrimethamine, an antimalarial drug, in the in vivo mouse. **Teratog Carcinog Mutagen.**, v. 20, p. 65-71 Feb., 2000.

WILCZYNSKI, J.R.; RADWAN, M.; KALINKA, J. The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions. **Front Biosci.**, United States, v. 1; n. 13, p. 2266-74, Jan, 2008.

WILDER, R. L. Hormones, pregnancy, and autoimmune diseases. **Ann. N Y Acad. Sci.**, United States, v. 840, p. 45, May, 1998.

WU, L.; CHEN, S. X.; JIANG, X. G.; CAO, J. P. *Toxoplasma gondii*: a simple Real-time PCR assay to quantify the proliferation of the apicoplast. **Exp Parasitol.**, United States, v. 123, n. 4, p. 384-7, Dec, 2009.

YANO, A.; MUN, H. S.; CHIN, M.; NOROSE, K.; HATA, K.; KOBAYAH, M.; AOSAI, F.; IWAKURA, Y. Roles of IFN-gamma on stage conversion of an obligate

intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Int Rev Immunol.**, v. 21, n. 4-5, p.405-21, Jul-Oct, 2002.

YAP, G. S.; LING, Y.; ZHAO, Y. Autophagic elimination of intracellular parasites: convergent induction by IFN- γ and CD40 ligation? **Autophagy**, Rhode Island, v. 3, n. 2, p.163–165, Mar-Apr, 2007.

ZENCLUSSEN, A. C. Regulatory T cells in pregnancy. **Springer Seminars in Immunopathology**, Berlin, v. 28, n. 1, p. 31-39, 2006.

ZHANG, H.; HU, X.; LIU, X.; ZHANG, R.; FU, Q.; XU, X. The Treg/Th17 imbalance in *Toxoplasma gondii*-infected pregnant mice. **Am J Reprod Immunol**, v. 67, n. 2, p.112-21, Feb, 2012.

ZHAO, Y.; FERGUSON, D. J.; WILSON, D. C.; HOWARD, J. C.; SIBLEY, L. D.; YAP, G. S. Virulent *Toxoplasma gondii* evade immunity-related GTPase-mediated parasite vacuole disruption within primed macrophages. **J. Immunol.**, New Jersey, v.182, n. 6, p.3775-81, Mar., 2009.

ANEXOS

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131

e-mail: cep@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº. 118/09 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO
REGISTRO CEP/UFU 052/09**

Projeto Pesquisa: Participação funcional de citocinas de perfil Th1 e Th2 em um modelo de interface materno-embriônico submetido à infecção experimental por Toxoplasma.

Pesquisador Responsável: Eloísa Amália Vieira Ferro

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega de relatório parcial: dezembro de 2009.

Data para entrega de relatório parcial: dezembro de 2010.

Data para entrega de relatório parcial: dezembro de 2011.

Data para entrega de relatório final: dezembro de 2012.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 17 de abril de 09

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador

• O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (item IV.2.d).

• O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise dos razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS item III.3.x), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (item V.3) que requeiram ação imediata.

• O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu encaminhamento.

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada para participar da pesquisa chamada **“Ação da azitromicina em vilos placentários humanos infectados por *Toxoplasma gondii*: um modelo experimental de tratamento da toxoplasmose congênita”**, sob responsabilidade dos pesquisadores: Dra Eloisa Amália Vieira Ferro, Dr José Roberto Mineo, Letícia de Souza Castro Filice e a médica obstetra Dra Maria Célia dos Santos. Nesta pesquisa estamos buscando entender como ocorre a infecção do parasito *Toxoplasma gondii* durante a gravidez.

Na sua participação você fornecerá a placenta resultante do parto, sabendo que a coleta deste material não trará prejuízos para sua saúde ou para a saúde de seu filho, uma vez que este material será normalmente expulso pelo seu organismo após o parto, e, então será coletada pela médica Dra Maria Célia e será entregue a Letícia para conduzir a pesquisa. Caso a placenta não fosse utilizada para esta pesquisa seria descartada após o parto. Além disso, você permitirá que os pesquisadores tenham livre acesso à sua ficha médica para sabermos se você possui toxoplasmose. A pesquisa trará futuros benefícios para mães e filhos com toxoplasmose.

Em nenhum momento você será identificada. Os resultados da pesquisa serão publicados e, ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum ônus e ganho financeiro por participar na pesquisa.

A senhora é livre para parar de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo para senhora ou para seu filho.

Uma cópia deste Termo livre e Esclarecido ficará com a senhora.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa a senhora poderá entrar em contato com os pesquisadores ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia:

Letícia de Souza Castro Filice
Laboratório de Histologia - ICBIM
Universidade Federal de Uberlândia
Campus Umuarama - Bloco 2B
Telefone/Fax: 3218-2240

José Roberto Mineo
Laboratório de Imunoparasitologia
Universidade Federal de Uberlândia
Campus Umuarama - Bloco 4C
Telefone: 3218-2195/ Fax: 3218-2333

Eloisa Amália Vieira Ferro
Laboratório Histologia - ICBIM
Universidade Federal de Uberlândia
Campus Umuarama - Bloco 2B
Telefone/Fax: 3218-2240

Comitê de Ética em Pesquisa
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Universidade Federal de Uberlândia
Campus Santa Mônica - Bloco "J"
Telefone: 3239-4531

Uberlândia, ____ de _____ de 2009

Assinatura da participante da pesquisa

Assinatura do pesquisador

Assinatura de testemunha