

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Alterações funcionais induzidas por células trofoblásticas em monócitos
infectados por *Toxoplasma gondii***

Andressa da Silva Castro

**Uberlândia
Maio ó 2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Alterações funcionais induzidas por células trofoblásticas em monócitos
infectados por *Toxoplasma gondii***

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial a obtenção do título de Mestre.

Aluna: Andressa da Silva Castro

Orientado: Prof^ª. Dr^ª. Eloisa Amália Vieira Ferro

Co-orientador: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

**Uberlândia
Maio ó 2012**

*Aquarela
(Joquinho)*

*“Numa folha qualquer eu desenho um sol amarelo
E com cinco ou seis retas é fácil fazer um castelo.
Corro o lápis em torno da mão e me dou uma luva,
E se faço chover, com dois riscos tenho um guarda-chuva.*

*Se um pinguinho de tinta cai num pedacinho azul do papel,
Num instante imagino uma linda gaivota a voar no céu.
Vai voando, contornando a imensa curva Norte e Sul,
Vou com ela, viajando, Hawai, Pequim ou Istambul.
Pinto um barco a vela branco, navegando, é tanto céu e mar num beijo azul.*

*Entre as nuvens vem surgindo um lindo avião rosa e grená.
Tudo em volta colorindo, com suas luzes a piscar.
Basta imaginar e ele está partindo, sereno, indo,
E se a gente quiser ele vai pousar.*

*Numa folha qualquer eu desenho um navio de partida
Com alguns bons amigos bebendo de bem com a vida.
De uma América a outra consigo passar num segundo,
Giro um simples compasso e num círculo eu faço o mundo.*

*Um menino caminha e caminhando chega no muro
E ali logo em frente, a esperar pela gente, o futuro está.
E o futuro é uma astronave que tentamos pilotar,
Não tem tempo nem piedade, nem tem hora de chegar.
Sem pedir licença muda nossa vida, depois convida a rir ou chorar.*

*Nessa estrada não nos cabe conhecer ou ver o que virá.
O fim dela ninguém sabe bem ao certo onde vai dar.
Vamos todos numa linda passarela
De uma aquarela que um dia, enfim, descolorirá.”*

Dedicatória

É com muita alegria e com sentimento de missão cumprida que encerro mais esta etapa de minha vida. Foram anos de muitos aprendizados, crescimento pessoal e profissional e desafios vividos e superados. Tudo isto só foi possível porque tive ao meu lado pessoas iluminadas que sempre me incentivaram e ajudaram no que foi preciso, e cada um, a sua maneira, contribuiu para o que sou hoje. Agradeço a Deus por ter colocado pessoas tão boas em minha vida, afinal de contas, a vida só tem sentido quando a dividimos com pessoas especiais.

Por isso, dedico esta conquista às pessoas mais especiais e importantes de minha vida: minha Família! Aos meus amados pais, Luciano e Gorete, e minha querida irmã Janayne, que são meu porto seguro, meus exemplos de caráter, bondade, grandeza espiritual, perseverança e dignidade. Vocês me ensinaram o caminho certo a seguir, estiveram ao meu lado nos momentos de tristezas e alegrias, e nunca deixaram de me apoiar em minhas decisões. Vibraram comigo a cada conquista, por mais simples que fosse, e me ajudaram a superar os momentos de dificuldades e desilusões. Foram vocês que me ensinaram a lutar por meus objetivos e a acreditar que com esforço, tudo que sonhamos um dia se realiza. Vocês despertam em mim a vontade de ser uma pessoa melhor a cada dia.

Obrigada por acreditarem em mim e serem meus melhores amigos. Amo vocês incondicionalmente!

Agradecimentos especiais

À minha orientadora, Dr^a. Eloisa Amália Vieira Ferro. Obrigada por me aceitar em sua equipe de trabalho e me acolher com tanto carinho e consideração. Por acreditar em minha competência e confiar a mim um projeto a ser desenvolvido com dedicação e seriedade. Por seu empenho em me ajudar na execução do projeto e pelas palavras de incentivo e reconhecimento de todo meu esforço. Agradeço de coração, por todas as oportunidades de crescimento e aprendizado que você me proporcionou. Agradeço ainda, pelos conselhos, pelas preocupações e pela amizade que sempre marcaram nossa relação. Este trabalho é fruto de nosso esforço. Muito obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador, Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo. Obrigada por ter aceitado fazer parte deste trabalho e por toda ajuda ao longo deste período. Pelo fornecimento de reagentes e, principalmente, por estar sempre disposto a me ajudar, tanto na bancada quanto na interpretação e discussão dos resultados. Suas considerações contribuíram muito para a melhoria deste estudo.

Ao Dr. Clindo Assis Martins Filho. Obrigada por ajudar com o aperfeiçoamento de nosso trabalho. Pelas idéias referentes à forma de apresentar os resultados e por toda paciência e disponibilidade em me atender e tirar minhas dúvidas.

À Dr^a. Neide Maria da Silva. Agradeço imensamente por sua ajuda na concretização deste trabalho. Pelas contribuições na banca de qualificação, por me ceder materiais de consumo e me permitir usar seus equipamentos. Agradeço também por todas as vezes que, em situações de dúvidas na execução de algum experimento, você teve paciência e boa vontade em me ajudar, muito obrigada!

À Dr^a. Deise Aparecida de Oliveira Silva. Obrigada pelas idéias para melhorar o trabalho, pelos momentos de discussão de resultados, pelas reações de ELISA. Enfim, você é um exemplo para todos nós que estamos na carreira acadêmica. Sua competência, humanidade e

disponibilidade em ajudar a todos, nos fazem te admirar não só como profissional, mas principalmente como ser humano.

À Celene, minha grande amiga! Querida, você foi um presente que Deus me deu e esta conquista é tanto minha quanto sua. Não tenho palavras para te agradecer por toda a ajuda ao longo desses anos, pelo companheirismo e pela amizade sincera. Você fez toda a diferença na realização deste trabalho e seu dedinho está presente nele nos mínimos detalhes: na reconstituição de reagentes, nos experimentos de bancada, nas análises dos resultados, na correção da dissertação, enfim, em tudo. Você foi meu braço direito durante essa fase de minha vida e eu jamais me esquecerei disso. Te admiro muito, sua generosidade como ser humano e sua competência como profissional são exemplos que levarei para o resto de minha vida. Muito obrigada pelo carinho que você tem comigo e por fazer parte de minha vida de uma forma tão especial. Você representa para mim a certeza de que nada em nossa vida acontece por acaso e de que Deus coloca pessoas maravilhosas em nossa caminhada para nos ajudar a seguir firmes no caminho do bem. Você sempre terá um lugarzinho separadinho em meu coração!

Às amigas: Mariana, Angélica e Bellisa. Vocês, além de amigas, são exemplos de perseverança, dedicação e generosidade. Considero vocês minhas “co-orientadoras” e agradeça por toda ajuda na execução deste projeto, sempre com carinho e boa vontade, além dos momentos de alegrias compartilhados. Em especial a você, Mariana, que foi quem me ensinou a trabalhar com cultura, me ajudou a dar os primeiros passos no laboratório e que, além disso, me presenteia com uma amizade verdadeira e gratificante que se estende para além do ambiente de trabalho.

Às queridas amigas: Priscila, Leticia, Mayara, Janice, Pâmela e Rafaela. Muito obrigada pela convivência diária, pelos momentos de descontração, pelo apoio constante, pelos desabaços e pelas conversas jogadas fora. Vocês tornaram essa fase de minha vida mais prazerosa e significativa.

Aos companheiros e amigos da histologia: Ester, Loyane, Rosiane, Luciana, Poliana, Alessandra, Dayana, Paulo Victor, Rômulo, Mário, Alexandra, Fabrício, Marcelito,

Mariane, Juscélia e Eliete. Obrigada pela convivência, pela prestatividade e pelas mais diversas ajudas.

À equipe da imunologia e da alergia, por me ajudarem sempre que precisei, pelos reagentes cedidos e equipamentos disponibilizados.

Às minhas amigas de mestrado: Bázinha, Luana, Monize e Maraisa. Vocês, mais do que ninguém sabem o que significa a conclusão de mais esta etapa em nossas vidas. Juntas, compartilhamos momentos de descontração e tensão, e juntas passamos por tudo isso e chegamos ao fim. Muito obrigada pela amizade, pelo carinho e por sermos o apoio umas das outras. Levo vocês em meu coração e em minhas lembranças!

Aos meus grandes e verdadeiros amigos: Zezito, Renato, Ana Carolina, Ana Paula, Fernanda, Larissa, Juliana, Nathália e Lorena. Vocês apesar de não estarem presentes no meu dia-a-dia participaram de todos os momentos importantes de minha vida e me incentivaram e apoiaram sempre que preciso. Vocês são a família que Deus me permitiu escolher. Obrigada por encherem minha vida de amor e afeto.

Às secretárias da Pós-Graduação, Lucileide e Lucélia. Obrigada pela atenção e disponibilidade em solucionarem meus problemas.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Mestrado.

“Viver é mais simples quando, no meio do caminho, conhecemos pessoas que dão valor especial à nossa existência.”

SUMÁRIO

RESUMO í 10	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	14
1.2. Formas infectantes	16
1.3. Cepas de <i>T. gondii</i>	17
1.4. Ciclo de vida	19
1.5. Resposta imune a <i>T. gondii</i>	20
1.6. Toxoplasmose congênita	22
1.7. Imunologia na gestação e <i>T. gondii</i> na interface materno-fetal	24
1.8. Trofoblasto e monócitos na interface materno-fetal	26
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo Geral	30
3.2. Objetivos Específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Cultura de células THP-1 e BeWo	31
4.2. Manutenção da cepa 2F1 de <i>T. gondii</i> em cultura	32
4.3. Tratamento de células THP-1 com sobrenadante de células BeWo não-infectadas ou infectadas com <i>T. gondii</i>	32
4.4. Dosagem de citocinas	35
4.4.1. Ensaio Imunoenzimático ó ELISA	35
4.4.2. Citometria de fluxo - Cytometric Bead Arrayö (CBA)	36

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular capaz de infectar humanos e causar a toxoplasmose. Esta doença é potencialmente grave em indivíduos imunocomprometidos e durante a gestação, uma vez que a infecção congênita pode comprometer a gestação e o desenvolvimento normal do embrião. Durante a gestação, células trofoblásticas constituem uma importante barreira materno-fetal e células imunes inatas, como os monócitos, se concentram ao redor dessas células trofoblásticas. Assim, interações entre células trofoblásticas e monócitos são importantes para manter o curso gestacional, especialmente em situações de infecção. Este estudo teve como objetivo avaliar se células trofoblásticas (linhagem BeWo) modulam a atividade funcional de monócitos (linhagem THP-1) na presença ou ausência de infecção por *T. gondii*. Inicialmente caracterizou-se o perfil de citocinas (MIF, IL-12, IL-6, IL-17A, TGF- β 1 e IL-10) secretadas por células THP-1 e BeWo não-infectadas e infectadas por *T. gondii*. Verificou-se que ambas as linhagens celulares exibem perfil de citocinas pró-inflamatórias quando infectadas. Posteriormente, células THP-1 foram estimuladas com sobrenadantes de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii* e, após esse estímulo, células THP-1 foram infectadas com *T. gondii*. A secreção de citocinas por células THP-1 foi avaliada, bem como a susceptibilidade dessas células à infecção por *T. gondii*. Os resultados demonstraram que o sobrenadante de células BeWo infectadas induziu células THP-1 não-infectadas a secretarem níveis maiores de citocinas pró-inflamatórias e o sobrenadante de células BeWo não-infectadas diminuiu a secreção de MIF, aumentou a secreção de IL-6 e não alterou a secreção de IL-12 e IL-17 por estas células THP-1. Além disso, os dois diferentes sobrenadantes foram capazes de induzir secreção menor de MIF e IL-12 e secreção maior de IL-6 por células THP-1 infectadas com *T. gondii*. A secreção de IL-17 por células THP-1 infectadas foi maior apenas com estímulo de células

BeWo infectadas. A secreção de TGF- 1 por células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas ou infectadas diminuiu, enquanto que a secreção de IL-10, nas mesmas condições, aumentou. Além disso, células THP-1 estimuladas, principalmente, com sobrenadante de células BeWo infectadas, foram mais resistentes à proliferação de *T. gondii*. Células THP-1 tratadas com rIL-6 foram menos permissivas à proliferação de *T. gondii* e na ausência desta citocina, a proliferação parasitária foi maior. Portanto, a secreção de IL-6 por células THP-1 está envolvida no controle da infecção por *T. gondii*. Adicionalmente, a secreção de IL-6 e MIF por células BeWo, mas não a secreção de TGF- 1, foi importante para controlar o parasitismo em células THP-1. Em conjunto, estes resultados sugerem que células trofoblásticas são hábeis em modular a atividade de monócitos e este processo pode estar associado à manutenção da gestação.

Palavras chaves: trofoblasto, monócitos, *Toxoplasma gondii*, citocinas.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an intracellular parasite that can infect humans and cause toxoplasmosis. This pathogenesis is potentially severe in immunocompromised individuals and during pregnancy because congenital infection can adversely affect both the gestation and normal development of the embryo. During pregnancy, trophoblast cells constitute an important maternal-fetal barrier and innate immune cells, such as monocytes, concentrate around them. Thus, interactions between trophoblast cells and monocytes are important to maintain the normal course of pregnancy, especially in situations of infection. This study aimed to evaluate if trophoblast cells (BeWo cell line) modulate the functional activity of monocytes (THP-1 cell line) in the presence or absence of *T. gondii* infection. The perfil of cytokines (MIF, IL-12, IL-6, IL-17A, TGF- 1 e IL-10) secreted by THP-1 and BeWo cells was characterized and both of the cell lines show profile of pro-inflammatory cytokines after the infection. Furthermore, THP-1 cells were stimulated with supernatants of BeWo cells previously infected or not with *T. gondii* and, after this, THP-1 cells were infected with *T. gondii*. The secretion of cytokines by THP-1 cells was then evaluated, as well as the susceptibility of these cells to *T. gondii* infection. The results demonstrated that the supernatant of infected BeWo cells induced non-infected THP-1 cells to secrete higher levels of pro-inflammatory cytokines and the supernatant of non-infected BeWo cells decreased the secretion of MIF, increased the secretion of IL-6 and not altered the secretion of IL-12 and IL-17 by these THP-1 cells. Furthermore, both of the supernatants induced lower secretion of MIF and IL-12 and higher secretion of IL-6 by THP-1 cells infected with *T. gondii*. The secretion of IL-17 by infected THP-1 cells was higher only with stimuli of infected BeWo cells. The secretion of TGF- 1 by THP-1 cells stimulated with the supernatants of uninfected or infected BeWo cells was down-modulated while the secretion of IL-10, in the same

conditions, was up-modulated. In addition, THP-1 cells stimulated, principally with the supernatants of previously infected BeWo cells, were more resistant to *T. gondii* proliferation. THP-1 cells treated with rIL-6 were less permissive to *T. gondii* proliferation and in the absence of this cytokine, this parasite proliferation increased. Thus, the secretion of IL-6 by THP-1 cells is involved in the control of *T. gondii* infection. Additionally, the secretion of IL-6 and MIF by BeWo cells, but not the secretion of TGF- β 1, was important to control the parasitism in THP-1 cells. Together, these results suggest that trophoblast cells are able to modulate the activity of monocytes and it is associated with the control and maintenance of pregnancy.

Keywords: trophoblast, monocytes, *Toxoplasma gondii*, cytokines

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário cosmopolita, parasito intracelular obrigatório capaz de infectar um amplo espectro de hospedeiros, que incluem todos os animais de sangue quente e alguns invertebrados (NEVES, 2002).

O parasito foi primeiramente identificado em dois países diferentes no ano de 1908, por Nicolle e Manceaux na Tunísia (África), em um roedor, *Ctenodactylus gundi* e, em São Paulo (Brasil), por Splendore em coelhos (REY, 2001; KAWAZOE, 2005), sendo o gênero e a espécie introduzidos em 1909 por Nicole e Manceaux. *Toxoplasma gondii* pertence ao Reino: Protista; Sub-reino: Protozoa; Filo: Apicomplexa; Classe: Sporozoa; Sub-classe: Coccidia; Ordem: Eucoccidia; Sub-ordem: Eimeriina; Família: Sarcocystidae; Gênero: *Toxoplasma*; Espécie: *Toxoplasma gondii* (REY, 2001).

Morfologicamente *T. gondii* possui estrutura arqueada, núcleo situado no meio do corpo ou mais próximo da extremidade posterior, membrana externa simples e membrana interna dupla, e todas as organelas de células eucariontes, dentre outras que são particularidades do parasito (REY, 2001). Na região anterior do parasito localiza-se o complexo apical constituído por organelas características de indivíduos pertencentes ao filo Apicomplexa, como: conóide, anel polar, microtúbulos subpeliculares, roptrias, micronemas e grânulos densos (NEVES, 2003).

Algumas dessas estruturas são essenciais no processo de adesão e invasão de *T. gondii* na célula alvo, visto que, assim como outros parasitos do filo Apicomplexa, esse processo ocorre por meio de mecanismos dinâmicos (BLADER; SAEIJ, 2009). As micronemas são responsáveis pela secreção de moléculas adesivas, denominadas proteínas micronemais transmembranas (TM-MICs), que agem no reconhecimento e na adesão inicial do parasito aos receptores da superfície da célula hospedeira. Já foram descritos 20 tipos de proteínas

secretadas pelas micronemas (ZHOU et al., 2005; BLADER; SAEIJ, 2009) e dentre elas, MIC1, MIC2, MIC4, MIC6 e MIC8 são essenciais nos processos de adesão parasitária (LIU et al., 2010; SHEINER et al., 2010). Estudos demonstraram que MIC2 é capaz de se ligar a moléculas de adesão presentes na superfície da célula hospedeira propiciando a migração de *T. gondii* para tecidos, inclusive os imunologicamente privilegiados, como cérebro, retina e placenta, promovendo a disseminação mais rápida do parasito no organismo hospedeiro (BARRAGAN; BROSSIER; SIBLEY, 2005).

Após a adesão nas células hospedeiras, *T. gondii* penetra ativamente na mesma, em um processo dependente de actina e miosina do parasito e dos microtúbulos da célula hospedeira (MEHTA; SIBLEY, 2010; SWEENEY et al., 2010). O processo de invasão do parasito na célula hospedeira é rápido, ocorrendo em poucos segundos. A locomoção do parasito se dá por meio de um mecanismo de motilidade denominado òglidingõ, definido por movimentos espiralares dirigidos pelo sistema actina-miosina parasitário (SIBLEY, 2004; CARRUTHERS, 2006; BARRAGAN; HITZIGER, 2008). Em etapa subsequente, ocorre a liberação de proteínas derivadas das roptrias (ROP1 a ROP29). Essas proteínas atuam aumentando a fluidez da membrana plasmática da célula hospedeira, facilitando a internalização do parasito (KIM; WEISS, 2004; BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008). Além disso, as proteínas secretadas pelas roptrias também se relacionam com a virulência do parasito, sendo que ROP18 é descrita como essencial em isolados de *T. gondii* de alta patogenicidade (BRADLEY; SIBLEY, 2007).

Os grânulos densos estão associados à manutenção e crescimento do parasito dentro do vacúolo parasitóforo, o qual é formado pela própria membrana plasmática das células hospedeira após o processo de invasão (NEVES, 2003; LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2008; PLATTNER; SOLDATI-FAVRE, 2008). Esses grânulos secretam glicoproteínas (GRA-1 a GRA-10) que são liberadas no interior do vacúolo parasitóforo durante e após a invasão da

célula hospedeira, permanecendo solúveis no lúmen do vacúolo ou associadas a ele (CARRUTHERS, 2002). São responsáveis por garantir uma fonte de nutrição ao parasito, sendo que, estudos demonstraram que *T. gondii* usa GRA-7 para redirecionar o transporte de nutrientes da célula hospedeira em direção ao lúmen do vacúolo parasitóforo (COPPENS et al., 2006). Além disso, os grânulos densos impedem a ligação de lisossomos ao vacúolo, auxiliando na evasão do parasito à resposta imune proveniente do hospedeiro (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007).

1.2. Formas infectantes

Toxoplasma gondii pode ser encontrado em três diferentes formas infectantes: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Taquizoítas (*tachis* = rápido) medem cerca de 2-4 μ m de comprimento e possuem em média 4-8 μ m de largura. São de formato crescente ou oval e representam o estágio de multiplicação rápida do parasito. São as formas encontradas durante a fase aguda da infecção, responsáveis pelas manifestações clínicas da doença, sendo também denominadas formas proliferativas (NEVES, 2003; MONTROYA; LIENSENFELD, 2004).

Os taquizoítas são encontrados dentro do vacúolo parasitóforo de diversas células, como nos líquidos orgânicos, excreções, células do sistema mononuclear fagocitário, células hepáticas, musculares, nervosas e submucosas (NEVES, 2003; TENTER, 2009). Após repetidas replicações, por meio de um processo denominado endodiogenia, células infectadas pelos taquizoítas se rompem e a forma infectante fica livre para invadir, rapidamente, células vizinhas. Taquizoítas são pouco resistentes à ação do suco gástrico, no qual são destruídos em pouco tempo, e dependendo das condições imunológicas do hospedeiro, transformam-se em bradizoítas localizados em cistos teciduais (NEVES, 2003; MONTROYA; LIENSENFELD, 2004; SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010).

Os bradizoítas (*brady* = lento) são morfologicamente semelhantes aos taquizoítas, porém, se multiplicam mais lentamente, expressam algumas moléculas estágio-específicas e são encontrados no interior de cistos teciduais (NEVES, 2003; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Ocorrem principalmente em tecidos nervosos e musculares esqueléticos e cardíacos, geralmente durante a fase crônica da infecção. São mais resistentes à ação da tripsina e da pepsina, e podem permanecer viáveis nos tecidos por vários anos (NEVES, 2003). No entanto, dependendo das condições imunológicas do hospedeiro, a infecção pode passar por um processo de reagudização e os bradizoítas voltam à forma taquizoíta de multiplicação e disseminação rápida. (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010).

Os esporozoítas representam a forma infectante encontrada em oocistos nas fezes dos felídeos. Estes oocistos são esféricos, medem cerca de 11 x 12,5µm e possuem parede dupla resistente ao meio (NEVES, 2003; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

A liberação desses oocistos pelos felídeos ocorre em um período de 7 ó 21 dias após a ingestão de parasitos e, sob condições favoráveis do meio ambiente, passam por um processo de esporulação e passam a conter em seu interior dois esporocistos com quatro esporozoítos cada, tornando-se, pois, infectantes (DUBEY, 2004; MONTOYA; LIESENFELD; 2004).

1.3. Cepas de *T. gondii*

As cepas de *T. gondii* podem ser classificadas em clonais e ãexóticasö. As clonais são representadas por três linhagens diferentes (tipo I, II e III) muito semelhantes geneticamente, sendo que a diferença genética entre elas é menor ou igual a 1% (MORDUE et al, 2001; SIBLEY; AJIOKA, 2008). São diferenciadas segundo suas respectivas virulências em

camundongos, podendo ser classificadas como cepas de alta, moderada e baixa virulência (MORDUE et al., 2001; MONTROYA; LIESENFELD, 2004; BLADER; SAEIJ, 2009).

Cepas tipo I (RH, CAST e VEL) são consideradas muito virulentas, pois a multiplicação intracelular de taquizoítas ocorre em ritmo acelerado e a produção de cisto é lenta. Camundongos infectados com essas cepas, na tentativa de controlar a infecção, desenvolvem forte resposta inflamatória que os leva à morte (REY, 2001; AJZENBERG, 2010). Já as cepas tipo II, como ME49, e tipo III, como VEG, apresentam moderada ou baixa virulência em camundongos, pois as formas taquizoítas se multiplicam lentamente e a formação de cistos teciduais é mais rápida, apresentando, pois, maior tendência de cronificação (REY, 2001; BLADER; SAEIJ, 2009).

Em seres humanos, as cepas de linhagem tipo I geralmente estão associadas a manifestações clínicas graves da doença. Já as cepas tipo II são mais comumente verificadas em quadros severos de toxoplasmose ocular, toxoplasmose congênita e em pacientes imunocomprometidos (MONTROYA; LIENSENFELD, 2004; BLADER; SAEIJ, 2009).

A virulência das cepas é um dos fatores que determinam o caráter patogênico das mesmas (SUZUKI; COLNEY; REMINGTON, 1989). Além disso, estudos recentes demonstram que algumas variabilidades nas manifestações clínicas da infecção por *T. gondii* estão associadas ao tipo de cepa (VILLENA et al., 2004).

As cepas exóticas ou atípicas são aquelas cujos genótipos diferem dos já identificados ou são constituídos por uma mistura entre os já descritos (BOOTHROYD, GRIGG, 2002; VILLENA et al., 2004). São comumente descritas em países com ampla variedade de hospedeiros para *T. gondii*, como Brasil e África, e estão mais associadas às formas clínicas graves de toxoplasmose ocular (AJZENBERG et al., 2002; BOOTHROYD, GRIGG, 2002).

1.4. Ciclo de vida

O ciclo de vida de *T. gondii* se processa em duas fases distintas: uma sexuada, que ocorre nas células do epitélio intestinal dos hospedeiros definitivos (felídeos dos gêneros *Felix* e *Lynx*) e uma assexuada, que ocorre nos tecidos de diversos hospedeiros intermediários, como mamíferos e aves (DUBEY, 1998; NEVES, 2003).

Como o ciclo de vida de *T. gondii* se processa em hospedeiros distintos, é classificado como heteroxeno (DUBEY, 1998; NEVES, 2003). Nos hospedeiros definitivos o ciclo tem início com a ingestão de taquizoítas, oocistos presentes no meio ambiente ou ainda cistos contendo bradizoítas. Ao penetrarem no epitélio intestinal dos felídeos, qualquer uma das três formas infectantes de *T. gondii* (taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas) passam por um processo de conversão para taquizoítas e intensa multiplicação por endodiogenia e merogonia, originando os merozoítos. Estes por sua vez, são liberados após o rompimento das células parasitadas e penetram em novas células epiteliais transformando-se nas formas sexuadas masculinas ou femininas, que após maturação formarão os gametas masculinos, ou microgametas (biflagelados e móveis) e os gametas femininos, ou macrogametas (imóveis). Os microgametas saem da célula onde estão e se locomovem até a célula onde se encontram os macrogametas, fecundando-os. Forma-se o ovo ou zigoto, que se desenvolve dentro do epitélio intestinal e passa a ser envolto por uma parede externa dupla, dando origem ao oocisto (DUBEY, 2004; NEVES, 2003).

Após o rompimento da célula epitelial parasitada, o oocisto é liberado para o meio externo junto com as fezes dos felídeos. Sua maturação ocorre no meio ambiente sob condições favoráveis de temperatura, oxigenação e umidade por meio de um processo denominado esporogonia. Em um período de 1 a 5 dias estes oocistos passam a apresentar dois esporocistos contendo quatro esporozoítos cada e, finalmente, se tornam infectantes no meio ambiente (DUBEY, 2004; NEVES, 2003).

Nos hospedeiros intermediários ocorre somente a fase assexuada do ciclo. As formas infectantes podem ser adquiridas por meio da ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais com bradizoítas no seu interior; ingestão de água, frutas e verduras contaminadas por oocistos; ingestão de taquizoítas a partir de líquidos orgânicos como leite, saliva e esperma; infecção congênita; transfusão sanguínea; transplante de órgãos e até mesmo por acidentes laboratoriais (BLADER; SAEIJ, 2009; SILVA; LANGONI, 2009). Qualquer uma destas formas, após passar pelas células do epitélio intestinal do hospedeiro, sofre um processo de conversão para taquizoítas e intensa multiplicação, rompe a célula hospedeira e penetra em outros tipos celulares do organismo formando os vacúolos parasitóforos. No interior destes vacúolos ocorrem divisões sucessivas dando origem a novos taquizoítas, que irão romper a célula parasitada e infectar novas células, caracterizando a fase proliferativa do ciclo, responsável pelas manifestações agudas da doença. Mecanismos imunológicos do hospedeiro são responsáveis pela diminuição da quantidade de parasitos circulantes, bem como pela transformação de taquizoítas em bradizoítas no interior de cistos teciduais, caracterizando a fase crônica da doença. (NEVES, 2003).

1.5. Resposta imune a *T. gondii*

Por ser um parasito intracelular obrigatório, o principal mecanismo de defesa contra *T. gondii* é mediado, especialmente, pela resposta imune celular (DENKERS; GAZZINELLI, 1998). Diferentes células participam deste processo de defesa, como células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos), células natural killer (NK), leucócitos polimorfonucleares e linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; FILISETTI; CANDOLFI, 2004; WILSON et al., 2010).

A resistência do hospedeiro ao parasito se dá basicamente por meio de atividades citotóxicas e da secreção de citocinas (GADDI; YAP, 2007). Durante a fase aguda da doença,

linfócitos TCD8⁺ desempenham função citotóxica, essencial para o controle do parasitismo. Além disso, linfócitos TCD4⁺ auxiliam na manutenção da resposta promovida por células TCD8⁺ e regulam diferentes mecanismos imunes contra o parasito (COMBE et al., 2005; JONGERT et al., 2010). Dessa forma, depois de estimulados, linfócitos TCD4⁺ se diferenciam em subpopulações de linfócitos α T helper, como por exemplo, linfócitos T helper 1 (Th1), linfócitos T helper 2 (Th2), linfócitos T helper 17 (Th17) e células T reguladoras, os quais diferem uns dos outros segundo o perfil de citocinas que secretam. Células Th1 secretam citocinas pró-inflamatórias, como interferon (IFN)- γ , fator de inibição de migração de macrófagos (MIF), interleucina (IL)-6, IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF- α), as quais são responsáveis pela resposta imune efetora contra *T. gondii*. Células Th17 secretam IL-17A, uma citocina pró-inflamatória que desempenha função importante no recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (KELLY et al., 2005; PASSOS et al., 2010). Já as células Th2 secretam citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-13, IL-5 e (FILISETTI; CANDOLFI, 2004). Células T reguladoras secretam IL-10 e fator transformador de crescimento (TGF- β) e são capazes de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, a atividade citotóxica de células NK e a maturação de células dendríticas (SAKAGUCHI, 2005; AKBAR et al., 2007).

Outro mecanismo de resposta imune contra *T. gondii* é desencadeado pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que são expressos na superfície de leucócitos, células NK e células dendríticas. Dentre esses, destacam-se os receptores Toll-like (TLRs), que são proteínas transmembranas com domínios que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), importantes no combate a vários patógenos, inclusive *T. gondii*. Estudos demonstraram que os TLRs reconhecem proteínas de superfície presentes no parasito e esta ligação induz uma via de sinalização intracelular dependente da molécula adaptadora MyD88,

capaz de controlar a disseminação do parasito (YAROVINSKY, 2008; SUKHUMAVASI et al., 2008; DENKERS, 2009).

Dessa forma, a resposta imune do hospedeiro contra *T. gondii* é fundamentalmente celular e do tipo pró-inflamatória. Entretanto, o parasito possui diversos mecanismos capazes de modular essa resposta imune, propiciando a evasão à esta resposta e sua sobrevivência nas células hospedeiras (DENKERS, 2003). Dentre estes artifícios, *T. gondii* tem a capacidade de interferir nas vias de sinalização intracelulares e dessa forma, alterar o padrão de citocinas secretadas ao seu favor. Isto ocorre, por exemplo, quando os antígenos parasitários inibem a translocação do fator de transcrição NF-kB para o núcleo celular, provocando a diminuição da secreção de IL-12 e TNF- (SHAPIRA et al., 2005; WILSON et al., 2010). Além disso, *T. gondii* pode induzir a ativação da via de sinalização STAT-3, a qual está envolvida na regulação de genes supressores de citocinas pró-inflamatórias (BUTCHER et al., 2005). O parasito pode, ainda, alterar a expressão de moléculas de MHC II em células apresentadoras de antígeno, comprometendo a apresentação de antígenos parasitários aos linfócitos (LANG et al., 2007; LÜDER et al., 2009); modular a expressão e produção da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), essencial para a síntese de óxido nítrico (LÜDER et al., 2003) e interferir nos processos de morte celular programada, induzindo a morte de células inflamatórias e impedindo a apoptose de células infectadas, de modo a evitar resposta inflamatória local e se manter viável nas células hospedeiras (LANG et al., 2007; ANGELONI et al., 2009).

1.6. Toxoplasmose congênita

A infecção por *T. gondii* causa a toxoplasmose, uma protozoonose que acomete cerca de metade da população mundial (BLADER; SAEIJ, 2009). A toxoplasmose geralmente é assintomática em indivíduos imunocompetentes, porém, é potencialmente grave em duas

situações: em pacientes imunocomprometidos, nos quais pode ocorrer a reagudização da infecção e em gestantes primo-infectadas, quando pode ocorrer a transmissão vertical do parasito para o embrião (RORMAN et al., 2006).

A transmissão vertical da toxoplasmose ocorre quando a mulher adquire a infecção durante a gestação (JONES et al., 2001), ou no período pré-concepcional (CHEMLA et al., 2002, BARBOSA et al., 2007). Nesta situação, o parasito, é capaz de migrar através da placenta e se replicar dentro de diferentes tecidos do feto ou embrião (LANG et al., 2007; KODJIKIAN, 2010). Além disso, mulheres infectadas cronicamente, quando imunodeprimidas, também podem transmitir o parasito ao feto, havendo reagudização da doença e posterior infecção placentária e fetal (CHEN et al., 2005; RORMAN et al., 2006).

Diversos fatores, como clima, hábitos alimentares e de higiene e valores culturais podem estar associados à ocorrência da toxoplasmose congênita (RORMAN et al., 2006). A doença pode causar sérios danos ao feto e manifesta-se em diferentes graus de gravidade dependendo da virulência da cepa do parasito, da capacidade da resposta imune da mãe e do período gestacional em que a mulher se encontra (SPALDING; AMENDOEIRA; CAMILO-COURA, 2003).

Infecções adquiridas pela mãe durante o primeiro trimestre de gestação podem resultar em 10-25% de casos de toxoplasmose congênita. Durante o segundo e terceiro trimestres de gestação, a incidência de infecções fetais aumenta para 30-40% e 60-65%, respectivamente. Entretanto, quanto mais tardiamente ocorra a infecção, menos graves são as conseqüências para o feto e menores são as taxas de abortos espontâneos verificadas em decorrência da doença (KRAVETZ; FEDERMAN, 2005; RORMAN et al, 2006). As manifestações clínicas nos recém-nascidos com toxoplasmose congênita podem se desenvolver de formas variadas antes e após o nascimento. Na maioria dos casos (70-90%) eles são assintomáticos ao

nascermem, e as manifestações da doença ocorrem ao longo da vida, podendo evoluir para quadros de coriorretinites, hidrocefalia e calcificações intracraniais (RORMAN et al, 2006).

1.7. Imunologia na gestação e *T. gondii* na interface materno-fetal

A gestação se caracteriza por um estado mantido por alterações imunológicas que se fazem necessárias para que ocorra a implantação embrionária e a manutenção do conceito. Estas mudanças ocorrem por meio de um processo de imunomodulação, em que o perfil de resposta imune predominante na placenta é do tipo Th2, caracterizado pela secreção de citocinas anti-inflamatórias reguladoras (ABOU-BACAR et al., 2004, VARGAS-VILLAVICENCIO; LÉON-NAVA; MORALES-MONTOR, 2009).

Entretanto, apesar de ser, geralmente, definida como uma condição predominantemente anti-inflamatória, estudos indicam que a gestação é mantida por um balanço entre perfis de resposta Th1 e Th2, que variam ao longo do período gestacional, de acordo com o estágio em que essa se encontra (FEST et al., 2007). Dessa forma, no início da gestação, há um perfil imune preferencialmente pró-inflamatório, com aumento na produção de quimiocinas e citocinas do tipo Th1, importantes no processo de invasão do trofoblasto e implantação do blastocisto ao endométrio (NARUSE et al., 2010). No segundo trimestre gestacional, tem-se a fase de tolerância fetal, caracterizada pela predominância de perfil imune do tipo Th2 e de células T reguladoras (RANGO, 2008). Finalmente, no terceiro trimestre gestacional, ocorre a infiltração de células imunológicas para a interface materno-fetal, criando um meio inflamatório necessário para o parto (KOGA; ALDO; MOR, 2009). Assim, esta alternância imunológica que ocorre ao longo da gestação é essencial e determinante para o sucesso gestacional.

Complicações graves na gestação podem estar associadas a distúrbios da imunidade celular, em particular das células T reguladoras, uma vez que, em casos de abortos

espontâneos a quantidade dessas células presentes na decídua é menor do que em casos em que a gestação cursa de forma normal (RANGO, 2008).

Além da imunidade adquirida, mediada por linfócitos T, células do sistema imune inato também possuem importante participação durante o período gestacional. Neste sentido, durante o primeiro trimestre gestacional, células NK uterinas são importantes na invasão do trofoblasto no endométrio e para a angiogênese. Os monócitos, por sua vez, são uma das primeiras células observadas no sítio de implantação e após se diferenciarem em macrófagos são importantes na manutenção da homeostase tecidual, por meio da fagocitose de células em apoptose e de debris celulares neste ambiente (HANNA et al., 2006; KOGA; ALDO; MOR, 2009). Isto sugere que o sistema imune inato não é indiferente ao feto e, pode ter função não somente na proteção do hospedeiro contra infecções, mas também na manutenção do equilíbrio imune da interface materno-fetal (FEST et al, 2007).

Estudos demonstraram que para se disseminar, *T. gondii* infecta preferencialmente monócitos em relação a outros tipos celulares e, portanto, são considerados de crucial importância nos processos de disseminação do parasito e subsequente estabelecimento da infecção no organismo hospedeiro (CHANNON; SEGUIN; KASPER, 2000; UNNO; KITO; TAKASHIMA, 2010).

Dessa forma, quando a gestação se dá concomitante à infecção por *T. gondii*, pode estabelecer-se um desequilíbrio imunológico capaz de resultar em problemas na gestação ou até mesmo abortos (LUPPI, 2003). A presença do parasito na interface materno-fetal induz uma resposta tipicamente pró-inflamatória, enquanto que a tolerância fetal é mantida por uma resposta predominantemente anti-inflamatória (LOPES et al., 2007). Assim, o sucesso gestacional depende da secreção equilibrada de citocinas pró- e anti-inflamatórias e da íntima relação estabelecida entre as células trofoblásticas e as células do sistema imunológico materno, por exemplo, os monócitos.

1.8. Trofoblasto e monócitos na interface materno-fetal

O trofoblasto é um tipo celular responsável pela adesão e invasão da mucosa uterina. Diferencia-se em duas populações celulares distintas: o citotrofoblasto, que corresponde a uma camada mononuclear e o sinciciotrofoblasto que é proveniente do citotrofoblasto (GUDE et al., 2004). Além disso, o trofoblasto exerce inúmeras atividades durante toda a gestação dentre elas: adesão, fixação e implantação do blastocisto ao endométrio, nutrição do embrião, regulação hormonal, fagocitose de elementos sanguíneos maternos e formação da parte fetal da placenta (FERRO, 2000).

O trofoblasto possui mecanismos próprios que possibilitam sua sobrevivência no organismo materno. Dessa forma, não expressam algumas proteínas de superfície, como o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, impedindo a apresentação de antígenos paternos ao sistema imunológico materno (ENTRICAN, 2002). O citotrofoblasto também é capaz de expressar moléculas de adesão e proteinases que possibilitam fixação e invasão, e ainda, fatores imunomoduladores importantes em permitir a tolerância materna ao feto que é semi alogêneo (NORWITZ et al., 2001).

Estudos têm demonstrado que células trofoblásticas são capazes de atrair monócitos para o ambiente da interface materno-fetal. Assim, os monócitos representam a população de leucócitos predominante no sítio de implantação do blastocisto e, no microambiente placentário, a quantidade dessas células imunes inatas aumenta ao longo da gestação. (FEST et al., 2007; KOGA; ALDO; MOR, 2009). A predominância de monócitos e macrófagos no ambiente da placenta está diretamente relacionada às características das próprias células trofoblásticas, as quais têm capacidade de secretar citocinas e quimiocinas que regulam a migração e diferenciação desses monócitos. Estes monócitos modulados pelas células trofoblásticas exibem um perfil de resposta diferente daqueles que não tiveram contato prévio com o trofoblasto, e podem secretar tipos e quantidades diferentes de citocinas, além de

tornarem-se mais ou menos susceptíveis a possíveis infecções por patógenos (FEST et al, 2007; KOGA; ALDO; MOR, 2009).

O trofoblasto expressa receptores que são capazes de reconhecer a presença de bactérias, vírus, parasitos, células em apoptose e tecidos danificados. Após este reconhecimento, o trofoblasto secreta citocinas que vão agir sobre as células imunes presentes na decídua, influenciando na resposta dessas células frente ao patógeno (KOGA; ALDO; MOR, 2009). Os TLRs representam a família predominante desses receptores nas células da interface materno-fetal. Dos 11 TLRs descritos, 10 já foram identificados em células do ambiente placentário e sua expressão pelo trofoblasto varia segundo o estágio gestacional. Cada TLR difere em suas especificidades, mas todos eles, após interagirem com seus ligantes, recrutam proteínas adaptadas à sinalização celular e ativam a secreção de citocinas, conduzindo a uma resposta inflamatória (KOGA; ALDO; MOR, 2009).

Assim, os mecanismos pelos quais células trofoblásticas modulam o funcionamento de monócitos na interface materno-fetal, são importantes no estabelecimento de uma resposta imune contra patógenos que podem colocar em risco o desenvolvimento e a sobrevivência do feto, como o observado em infecções por *T. gondii*.

Vários estudos *in vitro* são realizados utilizando como modelos experimentais linhagens celulares bem estabelecidas em cultura. Células trofoblásticas da linhagem BeWo foram isoladas de um coriocarcinoma humano em 1968 (PATTILLO; GEY, 1968). São capazes de formar monocamadas que não se diferenciam em sincício trofoblasto e crescem rapidamente em cultura. Semelhante às células trofoblásticas normais, células BeWo secretam citocinas, hormônios e expressam variados receptores de membrana comuns ao trofoblasto (FUJISAWA et al., 2000). São bastante susceptíveis à infecção por *T. gondii* (OLIVEIRA et al., 2006; BARBOSA et al., 2007) e portanto, podem ser utilizadas como um bom modelo experimental em estudos que são realizados na tentativa de estabelecer o papel de células trofoblásticas na

modulação do perfil imunológico durante a gestação, principalmente na presença de parasitos intracelulares como *T. gondii*.

Células mielomonocíticas da linhagem THP-1 foram isoladas do sangue periférico de uma criança com leucemia monocítica aguda. Expressam receptores para Fc e C3b, além dos ligantes LFA-1 e VLA-4 para as moléculas ICAM-1 e VCAM-1 respectivamente (TSUCHIYA et al, 1980; PFAFF et al., 2005b; BARRAGAN; HITZIGER, 2008). Podem ser mantidas em cultura por longos períodos e são permissivas ao crescimento de *T. gondii in vitro*, o que favorece a realização de estudos que avaliam a disseminação e a capacidade deste parasito em atravessar barreiras biológicas, como por exemplo, o ambiente transplacentário (CHANNON; SEGUIN; KASPER, 2000; BARRAGAN; SIBLEY, 2003).

Assim, estas duas linhagens celulares permitem o desenvolvimento de estudos que avaliam a interação de monócitos e células trofoblásticas, na presença de patógenos como *T. gondii*, como modelo *in vitro* da transmissão vertical do parasito.

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose congênita é uma doença com importante impacto nas taxas de mortalidade e morbidade de recém-nascidos e crianças. Diversos estudos tentam elucidar os mecanismos imunológicos que operam na interface materno-fetal e favorecem o sucesso da gestação, mas de maneira contraditória, podem facilitar a infecção placentária e fetal por patógenos intracelulares como *T. gondii*.

Monócitos são células envolvidas no processo de disseminação de *T. gondii* pelo organismo hospedeiro, constituem uma das principais populações de leucócitos no microambiente placentário e são atraídos a este microambiente por fatores secretados por células trofoblásticas.

Assim, estudos envolvendo linhagens de células trofoblásticas (BeWo) e monocíticas (THP-1) na presença de *T. gondii*, são de extrema importância para adicionar dados sobre a complexa rede de interação que se estabelece entre estas linhagens celulares, em que células trofoblásticas são capazes de modular a atividade funcional de monócitos, concomitante à infecção por *T. gondii*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

O presente trabalho visa elucidar a capacidade de células trofoblásticas (linhagem BeWo) modularem a atividade funcional de monócitos (linhagem THP-1), na presença de infecção por *T. gondii*.

3.2. Objetivos Específicos:

- Determinar o perfil de citocinas secretado por células THP-1 e BeWo, infectadas ou não com *T. gondii*;
- Determinar o perfil de citocinas secretado por células THP-1, infectadas ou não com *T. gondii*, após estímulo com sobrenadante de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*;
- Verificar o parasitismo em células THP-1 previamente estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*;
- Determinar a participação funcional de citocinas na proliferação de *T. gondii* em células THP-1.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultura de células THP-1 e BeWo

Células THP-1 (linhagem monocítica humana) e células trofoblásticas derivadas de coriocarcinoma humano (linhagem BeWo) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, EUA) e mantidas em cultura no Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia.

Células BeWo foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² (Ciencor Scientific, Brasil) contendo meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute; Gibco, Paisley, Inglaterra) suplementado com 25 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio, antibióticos (penicilina G a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) (meio completo). As células foram incubadas em atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂.

As células foram mantidas por passagens seriadas, a cada dois dias, por meio de tratamento da monocamada celular com 0,25% tripsina-0,02% EDTA, durante 5 minutos em atmosfera úmida a 37°C e de 5% de CO₂. As células descoladas do fundo do frasco foram transferidas para tubos de 15 mL e centrifugadas a 400 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI completo e distribuído em novos frascos de cultura de 25 cm² contendo 4 mL de meio RPMI completo, seguindo-se incubação a 37°C e 5% de CO₂.

A manutenção das células THP-1 seguiu a mesma metodologia citada anteriormente; entretanto, uma vez que estas células são cultivadas em suspensão, o meio RPMI-1640 foi suplementado com 10% de soro fetal bovino centrifugado a 400 x g durante 10 minutos antes de ser utilizado. Além disso, durante os repiques, não foi necessário a utilização de tripsina-EDTA, visto que células THP-1 são não-aderentes.

4.2. Manutenção da cepa 2F1 de *T. gondii* em cultura

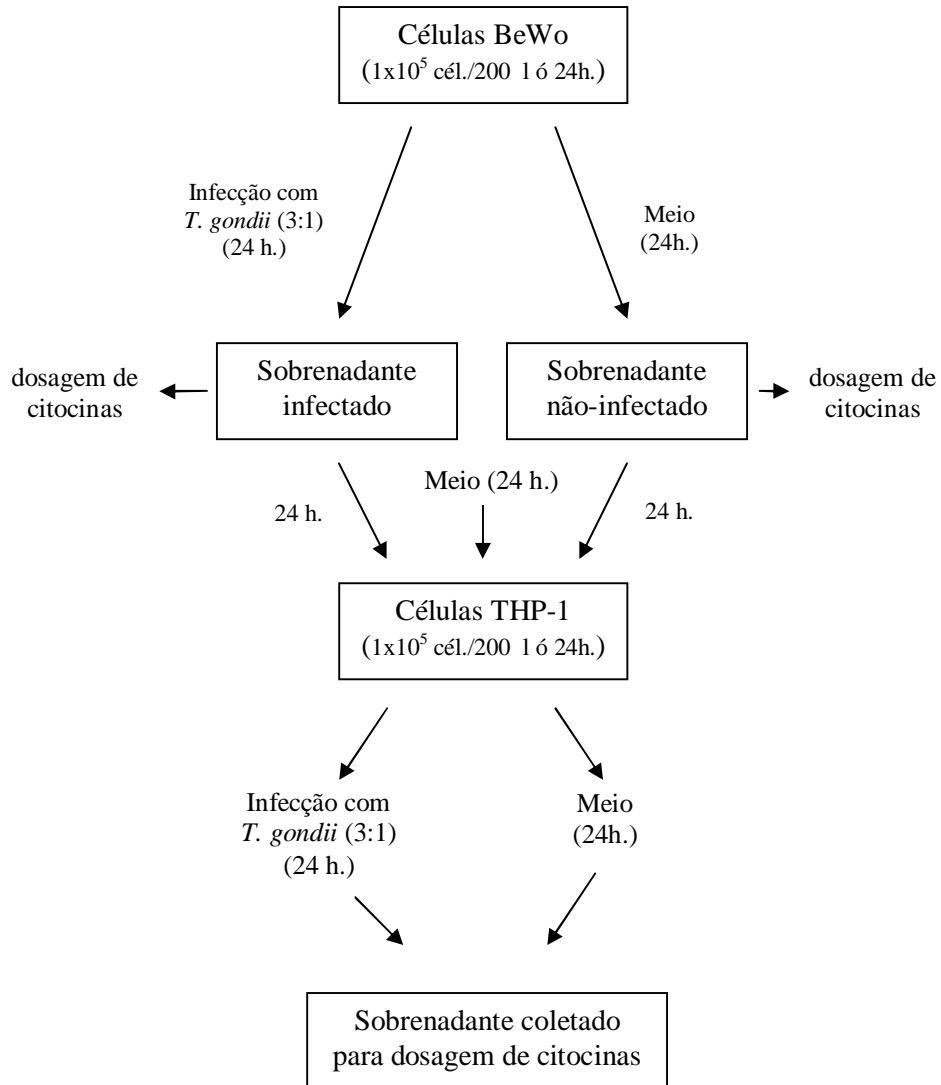
Os taquizoítas da cepa 2F1 de *T. gondii*, que são derivados da cepa RH e que expressam o gene da enzima β -galactosidase, foram cedidos gentilmente pelo professor Dr. Vern B. Carruthers da Escola de Medicina da Universidade de Michigan, EUA. Os parasitos foram mantidos em células HeLa cultivadas em meio RPMI suplementado com 2% de SFB (meio incompleto). À medida que a grande maioria das células infectadas em cultura encontrava-se lisada pelo parasito, o meio contendo taquizoítas livres foi centrifugado a 400 x g por 5 minutos, os parasitos homogeneizados em meio incompleto e distribuídos em novos frascos contendo células não infectadas.

4.3. Tratamento de células THP-1 com sobrenadante de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*

Células BeWo, coletadas a partir dos frascos de cultura, foram centrifugadas a 400 x g por 5 minutos e o sedimento foi ressuspensão em 1 ml de meio RPMI completo. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer e aquelas inviáveis foram excluídas do processo de quantificação pela coloração com o corante azul de tripan 0,4% (Sigma Chemical Co., Brasil). Posteriormente, células BeWo (1×10^5 células/200 μ l/poço) foram adicionadas a placas de cultura de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) e infectadas com taquizoítas de *T. gondii* da cepa 2F1 (3 parasitos : 1 célula) (200 μ l/poço) ou apenas acrescidas de meio completo e cultivadas a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas em condições de cultura, as placas foram centrifugadas a 400 x g, por 10 minutos e os sobrenadantes de cultura livres de células foram coletados de poços independentes, em triplicata, e armazenados em freezer a -80°C para posterior estímulo de células THP-1 e dosagem de citocinas.

Células THP-1, coletadas a partir dos frascos de cultura, foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços (1×10^5 células/200 l/poço) a 37°C e 5% de CO₂, por 24 horas. Posteriormente, estas células foram estimuladas com os sobrenadantes obtidos a partir do cultivo de células BeWo não-infectadas ou infectadas por *T. gondii*. Como controle, células THP-1 receberam apenas meio completo. Após 24 horas de estímulo, as placas foram centrifugadas (400 x g por 10 minutos), os sobrenadantes foram retirados e novo meio completo foi adicionado às células THP-1. Alternativamente, células THP-1 previamente estimuladas com os sobrenadantes de células BeWo foram infectadas com a cepa 2F1 de *T. gondii* (3 parasitos : 1 célula). Como controle, células THP-1 não estimuladas também foram infectadas com *T. gondii*. Células THP-1, infectadas ou não, foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 400 x g, por 10 minutos e os sobrenadantes livres de células e parasitos foram coletados e armazenados em freezer a -80°C para posterior dosagem de citocinas.

O esquema do experimento encontra-se representado no fluxograma 1.



Fluxograma 1: Estímulo de células THP-1 com sobrenadante de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii* para posterior dosagem de citocinas.

4.4. Dosagem de citocinas

4.4.1. Ensaio Imunoenzimático ó ELISA

A dosagem das citocinas em sobrenadantes de células THP-1 e BeWo foi realizada pela técnica ELISA tipo *sandwich*, segundo os protocolos recomendados pelos fabricantes para as citocinas IL-12, MIF e TGF- 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

Brevemente, placas de poliestireno de 96 poços de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura (anti-IL-12, anti-MIF e anti-TGF- 1) humanos por 18 horas à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) e bloqueio com PBS contendo 1% de soroalbumina bovina (BSA) (Sigma Chemical Co.) por 1 hora à temperatura ambiente, os sobrenadantes de cultura foram adicionados em triplicata. Para detecção de TGF- 1, os sobrenadantes de cultura foram pré-tratados com solução ácida de HCl 1N, neutralizada (NaOH 1,2M + HEPES 0,5M), para ativar a possível citocina existente no sobrenadante, uma vez que TGF- 1 é secretado pelas células como um complexo inativo. Paralelamente, curvas padrões das respectivas citocinas humanas recombinantes foram realizadas em diluições duplo-seriadas. Após duas horas de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS-T e foram adicionados os respectivos anticorpos de detecção biotinizados. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, novas lavagens foram realizadas e foi adicionado o conjugado streptavidina-peroxidase (R&D.) seguido de incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o último ciclo de lavagens, as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático (H₂O₂ 0,03% e tetrametilbenzidina [TMB]) e incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com a adição de solução de ácido sulfúrico 2 N. A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm e os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão, utilizando-se o *software* Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad

Laboratories Inc., Hercules, EUA). O limite de detecção obtido para cada análise foi 7,8 pg/mL (IL-12), 25 pg/mL (MIF), 25 pg/mL (TGF- β 1).

4.4.2. Citometria de fluxo - *Cytometric Bead Array* (CBA)

As citocinas humanas (IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IL-17A, IFN- γ e TNF- α) foram determinadas usando o kit *Cytometric Bead Array*TM (CBA; BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Os sobrenadantes de cultura foram colocados em tubos apropriados para citometria de fluxo (tubos FACS) e misturados com um *mix* de *beads* de captura para cada citocina. Em seguida, foram adicionados os anticorpos anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IL-17, anti-IFN- γ e anti-TNF- α humanos conjugados com ficoeritrina (PE) (BD Company, San Diego, CA) e a reação de captura foi mantida por 3 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, os tubos foram centrifugados (400 x g por 7 minutos) e os sobrenadantes cuidadosamente aspirados e descartados. O *pellet* contendo as *beads* revestidas com as citocinas detectadas nos sobrenadantes de cultura foi ressuspensão em tampão e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo em citômetro FACSCantoII BD[®] (BD Company, San Diego, CA). Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o software BD FACSDivaTM e os resultados foram expressos em intensidade média de fluorescência (*mean fluorescence intensity*, MFI) para todas as citocinas analisadas.

4.5. Ensaio de proliferação de *T. gondii* em células THP-1

O ensaio de proliferação de *T. gondii* (2F1) foi realizado de acordo com Teo e colaboradores (2007), com pequenas modificações.

células THP-1 (2×10^4 células/200 μ l/poço) foram cultivadas em placa de cultura de 96 Poços (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) a 37°C e 5% de CO₂, por 24 horas. Posteriormente, estas células foram estimuladas por 24 horas com os sobrenadantes obtidos a

partir do cultivo de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*, como descrito. Após 24 horas de estímulo, as placas foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos, os sobrenadantes foram retirados e as células THP-1 foram infectadas com taquizoítas da cepa 2F1 de *T. gondii* (3 parasitos : 1 célula).

Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, as placas de cultura foram novamente centrifugadas e os sobrenadantes foram removidos. Os parasitos não internalizados nas células foram removidos por uma lavagem com PBS contendo 1mM CaCl₂ e 1mM MgCl₂. Em seguida, foram adicionadas às células 100µL de tampão de lise (100 mM HEPES, pH 8,0, 1mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, 5mM ditioneitol), 160µL de tampão de ensaio (100mM tampão fosfato, pH7,3, 102 mM β -mercaptoetanol, 9mM MgCl₂) e 40 µL do substrato CPRG (clorofenol red- β -D-galactopiranosídeo; Roche) e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Após este período, a atividade enzimática da β -galactosidade foi mensurada a 570 nm usando leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, VA, EUA).

Paralelamente, foi construída uma curva padrão por meio de diluições seriadas, em duplicata de taquizoítas de *T. gondii*, a partir de uma suspensão de parasitos a 1x10⁶/poço/100µL. À curva padrão também foram adicionadas as soluções tampão de lise, tampão de ensaio e o substrato CPRG e a DO foi mensurada como descrito. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata. Os dados foram apresentados como índice de parasitismo de *T. gondii* em relação à curva padrão.

O esquema do experimento encontra-se representado no fluxograma 2.

4.6. Proliferação de *T. gondii* em células THP-1 tratadas com citocina IL-6

Células THP-1 (2x10⁴ células/200 l/poço) foram cultivadas em placa de cultura de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) a 37°C e 5% de CO₂, por 24 horas. Células

THP-1 foram pré-tratadas com rIL-6 (Peprotech, USA) em três concentrações distintas (25pg/ml, 50pg/ml e 100pg/ml) por mais 24 horas. Depois, a placa foi centrifugada a 400 x g, por 10 minutos, os sobrenadantes foram retirados e as células foram infectadas com a cepa 2F1 de *T. gondii* (3 parasitos:1 célula) e incubadas durante 3 horas. Em seguida, os poços da placa foram lavados para retirada dos parasitos não aderentes e as células foram novamente tratadas com rIL-6 nas mesmas concentrações por adicionais 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂. Como controles, as células foram infectadas e não tratadas. Finalmente, as células foram submetidas ao ensaio de proliferação de *T. gondii* por meio da reação de -galactosidade (TEO et al., 2007) já descrita. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

O esquema do experimento encontra-se representado no fluxograma 2.

4.7. Proliferação de *T. gondii* em células THP-1 tratadas com anticorpo anti-IL-6

Células THP-1 (2×10^4 células/200 μ l/poço) foram cultivadas em placa de cultura de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) a 37°C e 5% de CO₂, por 24 horas. Após este período, as células foram infectadas com a cepa 2F1 de *T. gondii* (3 parasitos:1 célula) e ficaram incubadas por 4 horas. Posteriormente, a placa foi centrifugada (400 x g por 10 minutos), o sobrenadante foi retirado e as células foram tratadas com soro normal de coelho a 3% e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 30 minutos, para bloquear receptores Fc presentes em células THP-1. Depois, a placa foi novamente centrifugada, o sobrenadante contendo soro normal de coelho foi retirado e as células foram tratadas com anticorpo monoclonal anti-IL-6 humano (Peprotech, USA), em uma concentração de 10 μ g/ml, por 24 horas e mantidas a 37°C e 5% de CO₂. Como controles, células THP-1 foram infectadas e apenas tratadas com soro normal de coelho, sem posterior tratamento com anticorpo anti-IL-6. Também foram utilizados como controle, células THP-1 infectadas, tratadas com soro normal

de coelho e posteriormente incubadas com anticorpo policlonal irrelevante, IgG de coelho anti-cabra (Jackson Immuno Research, USA) (10µg/ml). Finalmente, as células foram submetidas ao ensaio de proliferação de *T. gondii* por meio da reação de -galactosidade (TEO et al., 2007) já descrita. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

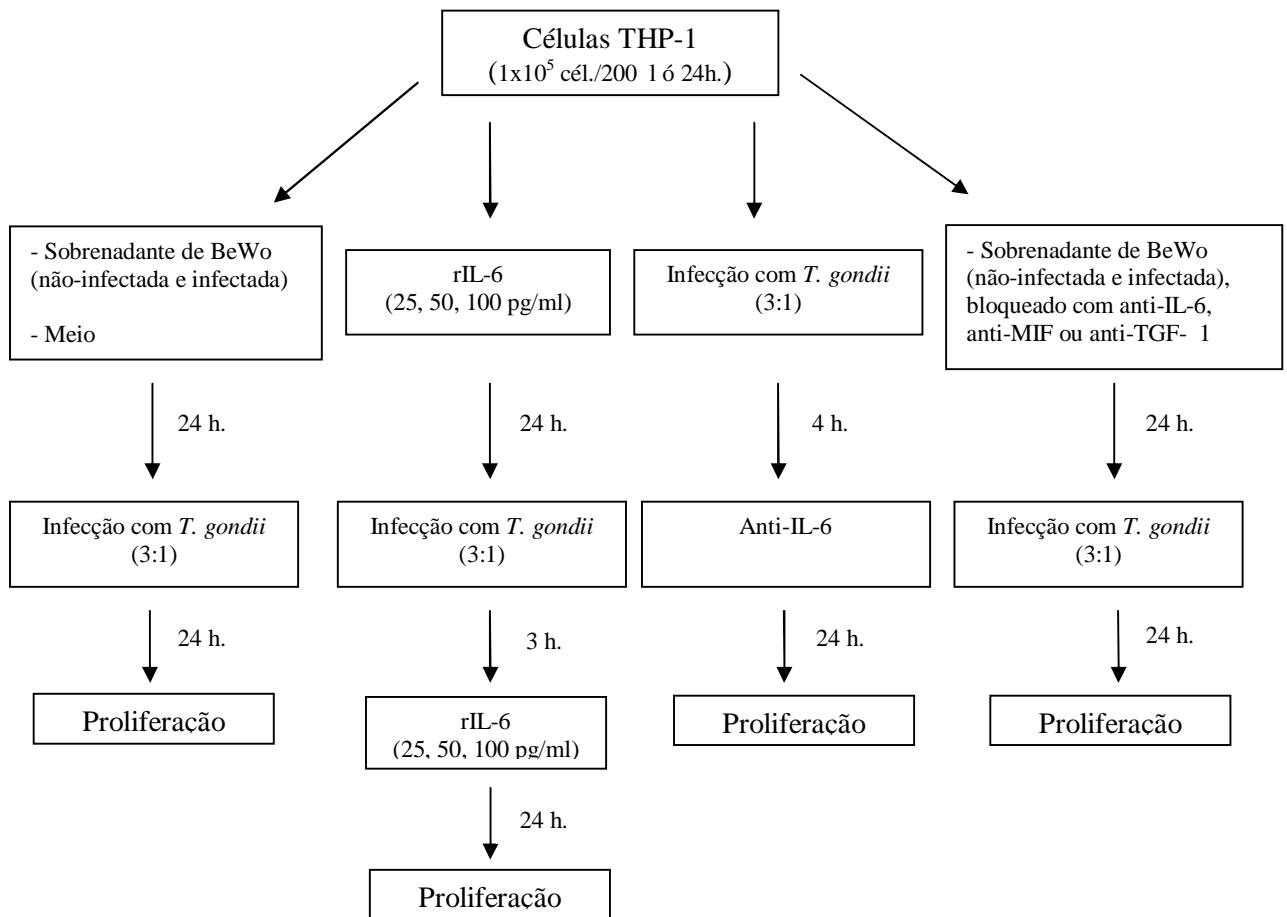
O esquema do experimento encontra-se representado no fluxograma 2.

4.8. Proliferação de *T. gondii* em células THP-1 estimuladas com sobrenadante neutralizado de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*

Conforme descrito no item 4.3, células BeWo foram mantidas em cultura e infectadas com *T. gondii* e tiveram seu sobrenadante coletado para estímulo de células THP-1. Dessa forma, células THP-1 mantidas em cultura, foram adicionadas a placas de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) (2×10^4 células/200 l/poço) e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Depois, os sobrenadantes coletados de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii* foram tratados, separadamente, com anticorpos anti-IL-6 (Peprotech, USA), anti-MIF (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) ou anti-TGF-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) humanos, em uma concentração de 10µg/ml, por 2 horas a 37°C e 5% de CO₂, para serem neutralizados. Em seguida células THP-1 foram estimuladas com esses sobrenadantes neutralizados e mantidas a 37°C e 5% de CO₂ por mais 24 horas. Antes de serem estimuladas com os sobrenadantes neutralizados, células THP-1 receberam soro normal de cabra a 3% e ficaram em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 30 minutos, para bloqueio de receptores Fc presentes em sua superfície. Como controles, células THP-1 foram estimuladas com sobrenadante não neutralizado de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*. Também foram utilizados como controle, células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo, infectadas ou não, neutralizado com anticorpo policlonal

irrelevante, IgG de coelho anti-cabra (Jackson Immuno Research, USA) (10 μ g/ml). Após as 24 horas de incubação, a placa contendo células THP-1 foi centrifugada (400 x g por 10 minutos) e o sobrenadante neutralizado de células BeWo, não-infectadas ou infectadas, foi retirado. Finalmente, células THP-1 foram infectadas com a cepa 2F1 de *T. gondii* (3 parasitos : 1 célula), incubadas por mais 24 horas e, posteriormente, submetidas ao ensaio de proliferação de *T. gondii* por meio da reação de β -galactosidade (TEO et al., 2007) já descrita. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

O esquema do experimento encontra-se representado no fluxograma 2.



Fluxograma 2: Proliferação de *T. gondii* em células THP-1 após as diferentes condições de tratamento.

4.9. Morfologia de células THP-1 não-infectadas e infectadas com *T. gondii*

Células THP-1 não-infectadas e infectadas por *T. gondii* foram coletadas de poços de cultura em um volume de 200 µL de meio. A partir destas amostras, foram feitos dois esfregaços em lâminas diferentes, um para células THP-1 não-infectadas e outro para células THP-1 infectadas. Após o esfregaço, as lâminas permaneceram à temperatura ambiente por 5 minutos e foram fixadas em formol 10%. Posteriormente, as lâminas foram coradas com azul de toluidina por 10 segundos, montadas com lamínulas, examinadas por microscopia óptica e fotografadas.

4.10. Análise dos dados do perfil de Assinaturas das Citocinas

O perfil geral de citocinas secretadas por células THP-1 e BeWo, nas diferentes condições estudadas, foi analisado de acordo com o cálculo de medianas globais (SILVA et al., 2011). Em cada linhagem celular foi determinada uma mediana global para cada citocina, a partir de todos os valores obtidos nas diversas condições de tratamento. Dessa forma, as medianas globais para as citocinas secretadas por células BeWo foram: IL-6 = 900,985 MFI; IL-10 = 0,055 MFI; IL-17A = 0,805 MFI; MIF = 2854,992 pg/ml; IL-12 = 1, 617 pg/ml e TGF- 1 = 2042,466 pg/ml. Para citocinas secretadas por células THP-1 as medianas foram: IL-6 = 27,03 MFI; IL-10 = 1,05 MFI; IL-17A = 0,12 MFI; MIF = 2529,55 pg/ml; IL-12 = 20,95 pg/ml e TGF- 1 = 1132,82 pg/ml.

Os valores das medianas globais calculados foram utilizados como cut-off para determinar a frequência com que as citocinas ocorreram em cada uma das condições de tratamento, nas diferentes linhagens celulares. Dessa forma, se o número de amostras por citocina para cada condição era igual a cinco, e para uma determinada citocina os valores das cinco amostras foram acima da mediana global calculada para essa citocina, sua frequência foi de 100%, enquanto que, se apenas três amostras estiveram acima do valor da mediana

4.12. Normas de biossegurança

Todos os procedimentos de cultura celular, bem como manuseio de material biológico, utilização de vidraria, equipamentos e reagentes químicos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005).

4.13. Aprovação do Comitê de Ética

O projeto de pesquisa deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desta Universidade, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres ou materiais biológicos humanos (ANEXO I).

5. RESULTADOS

5.1. Células THP-1 e BeWo infectadas com *T. gondii* secretam preferencialmente citocinas pró-inflamatórias

O perfil de citocinas secretadas por células THP-1 não-infectadas ou infectadas por *T. gondii* foi avaliado pela mensuração de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias por ELISA (IL-12, MIF e TGF- β 1) ou pelo kit CBA (IL-2, IL-4, TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-10 e IL-6) (Fig.1).

Células THP-1 infectadas com *T. gondii* secretaram maiores quantidades das citocinas MIF, IL-12 e IL-6 quando comparadas aos controles não-infectados. Ao contrário, células THP-1 infectadas com *T. gondii* secretaram níveis menores das citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β 1) do que células não-infectadas. A secreção da citocina IL-17A não foi estatisticamente diferente entre as condições de células THP-1 infectadas e não-infectadas (Fig.1a-f).

As mesmas citocinas foram mensuradas no sobrenadante de células BeWo, não-infectadas e infectadas com *T. gondii*, e resultados semelhantes àqueles obtidos para células THP-1 foram verificados. Dessa forma, células BeWo, quando infectadas com *T. gondii*, secretaram níveis maiores das citocinas MIF, IL-12 e IL-6 e níveis menores de IL-10 e TGF- β 1 em relação ao controle, tendendo a um perfil de resposta pró-inflamatória. A citocina IL-17A foi secretada em níveis maiores por células BeWo não-infectadas (Fig.2a-f).

As assinaturas das citocinas representam de outra forma o perfil de resposta de células THP-1 e BeWo não-infectadas ou infectadas por *T. gondii*. Semelhante aos resultados já apresentados observa-se que ambas as células quando infectadas por *T. gondii* passaram a apresentar um perfil de resposta caracteristicamente pró-inflamatório (Fig.3). Assim, células THP-1 não-infectadas apresentaram um perfil clássico de secreção de citocinas anti-

inflamatórias (IL-10 e TGF- β 1); em contrapartida, após a infecção elas passaram a apresentar um perfil de resposta tipicamente pró-inflamatório (IL-17A, MIF e IL-12) (Fig.3a). Em células BeWo, na condição de não-infecção, a frequência de citocinas foi significativa para IL-17A e TGF- β 1. Porém, quando foram infectadas, essas células assumiram um perfil de resposta pró-inflamatória, evidenciado pela presença significativa de citocinas clássicas deste perfil, como IL-12 e MIF (Fig.3b).

A produção de IL-2, IL-4, TNF- α e IFN- γ também foi mensurada por citometria de fluxo utilizando-se o kit CBA; entretanto os resultados obtidos foram inferiores ao limite de detecção em todas as condições analisadas (dados não mostrados).

5.2. Células BeWo alteram a secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias por células THP-1

A análise referente à secreção de citocinas por células THP-1, após estímulo com sobrenadantes de cultura de células BeWo infectadas ou não-infectadas com *T. gondii*, também foi realizada por meio de ELISA ou citometria de fluxo. Os dados foram divididos em dois grupos: (I) células THP-1 não-infectadas, estimuladas ou não-estimuladas (controle) com sobrenadantes de cultura de células BeWo não-infectadas ou infectadas e (II) células THP-1 infectadas após serem estimuladas ou não-estimuladas (controle) com sobrenadantes de cultura de células BeWo não-infectadas ou infectadas com a cepa 2F1 de *T. gondii*.

A secreção de MIF por células THP-1 não-infectadas e estimuladas com sobrenadantes de células BeWo não-infectadas foi menor quando comparada ao respectivo controle (Fig.4a). Entretanto, quando células THP-1 foram estimuladas com sobrenadantes de células BeWo previamente infectadas, a secreção da citocina foi maior quando comparada tanto ao controle quanto à condição de estímulo com sobrenadante de células BeWo não-infectadas (Fig.4a). Com relação ao grupo de células THP-1 infectadas, observou-se que, sob

estímulo com sobrenadante de células BeWo, não-infectadas ou infectadas, a secreção de MIF foi menor do que no grupo controle (Fig.4a). Além disso, células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas secretaram menor quantidade de MIF do que quando estimuladas com sobrenadantes de células previamente infectadas (Fig.4a).

Células THP-1 não-infectadas e estimuladas com sobrenadantes de células BeWo não-infectadas não apresentaram diferença significativa na secreção de IL-12 quando comparado ao controle, com secreção de níveis basais de IL-12 (Fig.4b). Entretanto, quando estimuladas com sobrenadantes de células BeWo infectadas, secretaram níveis significativamente maiores de IL-12 quando comparadas ao controle e ao estímulo com sobrenadante de células BeWo não-infectadas (Fig.4b). Já no grupo de células infectadas, observou-se que após ambos os estímulos, células THP-1 secretaram níveis significativamente menores de IL-12 quando comparadas às células infectadas sem estímulo prévio (Fig.4b). Além disso, quando o estímulo usado foi o sobrenadante de células BeWo infectadas, a secreção de IL-12 foi maior comparado ao sobrenadante de células não-infectadas (Fig.4b).

A análise da secreção de IL-6 revelou que células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas ou não-infectadas secretaram mais IL-6 do que células THP-1 não-estimuladas, em ambos os grupos não-infectado e infectado (Fig.4c). Além disso, células THP-1 infectadas e não-infectadas secretaram mais IL-6 ao serem estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas comparado ao sobrenadante de células BeWo não-infectadas (Fig.4c).

Os resultados referentes à secreção de IL-17A demonstraram que células THP-1 não-infectadas ou infectadas, quando estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas ou infectadas, secretaram níveis da citocina estatisticamente semelhante aos seus respectivos controles (Fig.4d). Entretanto, células THP-1 infectadas, após estímulo com sobrenadante de células BeWo previamente infectadas, secretaram mais IL-17A comparado

ao sobrenadante de células BeWo não-infectadas (Fig.4d). No grupo de células THP-1 não-infectadas, essa diferença estatística não foi verificada (Fig.4d).

Células THP-1 não-infectadas secretaram níveis menores de TGF- 1 quando estimuladas com os diferentes sobrenadantes, comparadas ao controle (Fig.4e). Além disso, quando foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo previamente infectadas, a secreção de TGF- 1 foi ainda menor (Fig.4e). Já no grupo de células THP-1 infectadas, observou-se que células estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas secretaram quantidades de TGF- 1 semelhantes ao controle, enquanto que quando estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas, a secreção da citocina foi menor quando comparado às demais condições (Fig.4e).

Quanto à secreção de IL-10 observou-se que células THP-1, não-infectadas e infectadas, quando estimuladas com os diferentes sobrenadantes, secretaram mais IL-10 quando comparadas ao respectivo controle (Fig.4f). Além disso, a secreção de IL-10 foi ainda maior quando células THP-1 foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo previamente infectadas (Fig.4f).

A produção de IL-2, IL-4, TNF- e IFN- também foi mensurada por citometria de fluxo utilizando-se o kit CBA; entretanto, os resultados obtidos foram inferiores ao limite de detecção em todas as condições analisadas (dados não mostrados).

Analisando-se as assinaturas das citocinas, verificou-se que nas condições em que células THP-1 não foram infectadas, o perfil de citocinas foi alterado apenas quando essas células foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo previamente infectadas. Nesse caso, o perfil de resposta anti-inflamatória sofreu uma modulação e conseqüente secreção de citocinas inflamatórias como IL-12 e IL-6 (Fig.5A).

Já nas condições em que células THP-1 foram infectadas após os diferentes tratamentos, observou-se que após estímulo com sobrenadante de células BeWo não-

infectadas, o perfil se manteve pró-inflamatório (Fig.5B). Entretanto, as citocinas IL-17A e IL-12 passaram a apresentar frequência menor que 50%; já IL-6 apresentou frequência maior que 50% (Fig.5B). Em contrapartida, quando células THP-1 foram infectadas após estímulo com sobrenadante de células BeWo previamente infectadas, todas as citocinas pró-inflamatórias avaliadas, apresentaram frequência maior que 50% e o perfil geral foi caracteristicamente inflamatório (Fig.5B).

5.3. Células THP-1 estimuladas com sobrenadantes de células BeWo são menos permissivas à proliferação de *T. gondii*

Para determinar se células BeWo seriam capazes de modular a susceptibilidade de células THP-1 à infecção por *T. gondii*, células THP-1 foram estimuladas com sobrenadantes de células BeWo não-infectadas ou infectadas por *T. gondii* e, posteriormente as células THP-1 foram infectadas e a proliferação do parasito foi mensurada nesta população celular (Fig.6).

Observou-se que células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas ou previamente infectadas com *T. gondii* foram menos permissivas à proliferação de *T. gondii* do que células THP-1 não-estimuladas (Fig.6). Além disso, ao se comparar a proliferação de *T. gondii* entre células THP-1 estimuladas com os dois diferentes sobrenadantes observou-se que a proliferação do parasito foi menor em células THP-1 que foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo previamente infectadas (Fig.6).

5.4. Interleucina-6 está envolvida no controle do parasitismo em células THP-1

Nossos resultados demonstraram que apenas a secreção da citocina IL-6 apresentou associação com o parasitismo em células THP-1 (Fig.7c). Assim, células THP-1 infectadas após estímulo com sobrenadantes de células BeWo, não-infectadas ou infectadas, secretaram mais IL-6 e foram menos susceptíveis à proliferação do parasito do que células THP-1

infectadas sem estímulo prévio (Fig.7c). Além disso, células THP-1 infectadas após estímulo com sobrenadante de células BeWo infectadas secretaram mais IL-6 do que células THP-1 infectadas após estímulo com sobrenadantes de células BeWo não-infectadas e, neste caso, o parasitismo foi ainda menor.

A análise da secreção das demais citocinas (MIF, IL-12, TGF- 1, IL-10 e IL-17A) revelou que não houve associação entre os níveis de tais citocinas e o grau de parasitismo (Fig.7a, b, d, e, f).

Uma vez que a citocina IL-6 secretada por células THP-1 apresentou associação com o índice de parasitismo, experimentos foram realizados para demonstrar a influência dessa citocina no controle de *T. gondii*. Assim, células THP-1 foram submetidas ao tratamento com rIL-6 em diferentes concentrações e o parasitismo foi mensurado (Fig.8a). Os resultados demonstraram que o parasitismo em células THP-1 tratadas com rIL-6 (25 pg/ml ou 50 pg/ml) não apresentou diferença estatística em relação ao controle. Entretanto, quando células THP-1 foram tratadas com IL-6 (100 pg/ml) o parasitismo diminuiu significativamente em relação àquelas células infectadas e não tratadas com a citocina (Fig.8a).

Outra forma de avaliar a influência de IL-6 no controle do parasitismo em células THP-1 foi por meio do bloqueio desta citocina no sistema. Neste caso, células THP-1 tratadas com anti-IL-6 apresentaram parasitismo maior do que células THP-1 infectadas e não tratadas com o anticorpo (Fig.8b). Células THP-1 infectadas e tratadas com anticorpo irrelevante (IgG de coelho anti-cabra) não apresentaram diferença estatística em relação ao controle (dados não mostrados).

5.5. MIF e IL-6 secretados por células BeWo estão envolvidos no controle do parasitismo em células THP-1

Para investigar quais poderiam ser os fatores solúveis secretados por células BeWo que influenciaram no controle do parasitismo em células THP-1, as três citocinas (MIF, TGF-1, IL-6) secretadas em maiores quantidades por células BeWo foram neutralizadas, separadamente, nos sobrenadantes dessas células, e esses sobrenadantes neutralizados foram utilizados para estimular células THP-1 que seriam infectadas posteriormente.

Observou-se que em células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo neutralizado com anti-IL-6, tanto sobrenadante de células BeWo não-infectadas quanto com sobrenadante de células BeWo previamente infectadas, o parasitismo foi maior em relação ao controle (Fig.9). Resultados semelhantes foram observados quanto à neutralização do sobrenadante com anti-MIF. Assim, células THP-1 tiveram índice de parasitismo maior quando foram estimuladas com os diferentes sobrenadantes neutralizados com anti-MIF (Fig.9).

Diferentemente, quando células THP-1 foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo, infectadas ou não infectadas, neutralizado com anti-TGF- 1 não foram verificadas diferenças estatísticas significantes em relação ao controle (Fig.9).

Células THP-1 tratadas com anticorpo irrelevante (IgG de coelho anti-cabra) e posteriormente infectadas, não apresentaram diferença significativa em relação ao controle (dados não mostrados).

5.6. Morfologia de células THP-1 não-infectadas e infectadas por *T. gondii*

Células THP-1 não-infectadas por *T. gondii* apresentaram morfologia típica com aparência globosa, núcleo excêntrico e típico crescimento agrupado em condições de cultura (Fig.10a). Células THP-1 infectadas apresentaram as mesmas características morfológicas, entretanto, observa-se claramente a formação do vacúolo parasitóforo com taquizoítas em seu interior (Fig.10b).

6. DISCUSSÃO

Durante a gestação, o organismo materno sofre diversas transformações hormonais e imunológicas que são fundamentais para manter o curso normal da gravidez. Assim, durante o período gestacional, o perfil de resposta imune materno é controlado principalmente por um padrão de células T helper tipo 2 (Th2), tendendo a um perfil de secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β (LUPPI, 2003; RAGHUPATHY, 2001). Entretanto, essa tendência ao perfil de citocinas Th2 faz com que o sistema imunológico materno seja potencialmente mais susceptível a agentes patológicos (VARGAS-VILLAVICENCIO; LÉON-NAVA; MORALES-MONTOR, 2009). Alguns desses patógenos possuem a capacidade de atravessar a barreira placentária e atingir o feto, gerando consequências graves que podem levar ao aborto (CHAOUAT et al., 2004). *Toxoplasma gondii* é um destes microorganismos patogênicos que podem ser transmitidos verticalmente ao feto, comprometendo seu desenvolvimento normal (WONG, REMINGTON, 1994).

Estudos prévios demonstraram que células trofoblásticas, ao mesmo tempo em que promovem a manutenção do conceito, podem, em casos de infecções, enviar sinais que modificam a ação de monócitos presentes no microambiente da placenta, comprometendo o curso normal da gestação (ABRAHAMS et al., 2005). Isto ocorre porque o trofoblasto expressa receptores de reconhecimento padrão, os quais funcionam como sensores capazes de reconhecerem a presença de bactérias, vírus, parasitos e até mesmo células mortas. Assim, após esse reconhecimento, células trofoblásticas secretam citocinas que agem sobre células imunes presentes na decídua e espaço intervilosos, alterando a atividade funcional das mesmas (COSTELLO; JOYCE; ABRAHAMS, 2007). Além disso, estudos envolvendo a interação de células THP-1 e células BeWo, demonstraram que células THP-1 migram em direção à decídua porque células trofoblásticas BeWo são capazes de secretar quimiocinas que as

atraem, tais como GRO- α , MCP-1 e IL-8 (FEST et al., 2007) e que o acúmulo excessivo de células mononucleares na placenta está associada ao risco aumentado de partos prematuros ou nascimento de bebês abaixo do peso normal (MENENDEZ et al., 2000). Uma vez que monócitos são uma das principais células que *T. gondii* utiliza para se disseminar, sua presença na interface materno fetal pode estar diretamente relacionada à transmissão vertical da toxoplasmose (COURRET et al., 2006).

Dessa forma, os resultados do nosso estudo mostraram como células trofoblásticas da linhagem BeWo, importantes na barreira materno fetal, podem interagir com células do sistema imune inato, como por exemplo, monócitos da linhagem THP-1, modulando a atividade funcional desses monócitos frente à infecção por *T. gondii*.

A infecção de células THP-1 com *T. gondii* induz à produção de citocinas com perfil de resposta pró-inflamatória, caracterizado pela secreção aumentada de citocinas pró-inflamatórias e diminuição na produção de citocinas anti-inflamatórias. Esta alteração no padrão de produção de citocinas pode ser um mecanismo de resposta típico para tentar controlar a disseminação do parasito.

O perfil de resposta de células BeWo não-infectadas e infectadas também foi analisado e verificou-se que células BeWo quando infectadas, também apresentaram um perfil de resposta pró-inflamatória. Entretanto, a produção de IL-17A, que é uma importante citocina pró-inflamatória, por células BeWo infectadas foi menor do que em células BeWo não-infectadas, diferente do que foi observado com as demais citocinas pró-inflamatórias.

A interleucina-17 é uma citocina que possui papel importante no recrutamento e desenvolvimento de neutrófilos no sítio de inflamação e no combate contra diversos patógenos (MIYAMOTO et al., 2003; WITOWSKI; KSIAZEK; JÖRRES, 2004). Entretanto, alguns trabalhos demonstraram que em gestantes, o aumento de células Th17 no sangue periférico e na decídua, e consequente aumento da produção de IL-17 foi relacionado à

ocorrência de abortos espontâneos recorrentes (WANG et al., 2010). Dessa forma, o fato de IL-17A ter sido produzida em menores quantidades em células BeWo infectadas pode ser uma estratégia de defesa do próprio trofoblasto, para tentar controlar a resposta inflamatória decorrente da secreção das demais citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a assinatura das citocinas de células BeWo demonstrou que IL-10 é frequente na condição de BeWo infectada. Estes achados sugerem que o trofoblasto estabelece mecanismos que tentam controlar a resposta inflamatória que é exacerbada na presença do parasito.

Após a análise individual dos perfis de citocinas secretadas por células THP-1 e BeWo, foi analisada a influência dos sobrenadantes de células BeWo no perfil de citocinas secretadas por células THP-1, infectadas ou não por *T. gondii*. Isso porque, no ambiente transplacentário, principalmente quando a gestação ocorre concomitante a algum tipo de infecção, o perfil de produção de citocinas pelos monócitos pode ser modificado a fim de favorecer o sucesso da gestação.

Trabalhos anteriores mostraram que MIF está envolvido na ativação de macrófagos e na morte de parasitos intracelulares, como *Leishmania major* (JÜTTNER et al., 1998). Além disso, também foi observado que após a estimulação *in vitro* com *T. gondii*, células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos geneticamente modificados em MIF (MIF^{-/-}) produziram quantidades significativamente menores de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF- α , sugerindo que MIF é capaz de atuar na ativação de outras citocinas importantes em processos inflamatórios (FLORES et al., 2006). Outros estudos que analisaram as funções de MIF demonstraram que vilos de placentas humanas infectados com *T. gondii* mostraram-se mais resistentes à infecção quando tratados com esta citocina (GOMES et al., 2011). Assim, estes resultados sugerem que MIF possa exercer um importante papel na resposta imune contra parasitos intracelulares, principalmente, no microambiente da placenta.

Os resultados encontrados no presente trabalho demonstraram que células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células trofoblásticas BeWo não-infectadas, secretaram menos MIF do que células THP-1 não-estimuladas. Estes dados sugerem que na ausência de infecção com *T. gondii*, células trofoblásticas são capazes de regular negativamente a secreção da citocina inflamatória MIF pelos monócitos, contribuindo para o estabelecimento de um ambiente favorável à manutenção do feto. Entretanto, quando células THP-1 foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo previamente infectadas, a secreção de MIF foi maior em relação ao controle e às células estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas, indicando que a presença do parasito em células trofoblásticas induz essas células a secretarem mediadores que atuam sobre os monócitos, tornando-os mais inflamatórios.

Corroborando com nossos resultados, trabalhos mostraram que monócitos coletados do espaço interviloso de placentas infectadas com *Plasmodium falciparum* secretaram quantidades maiores de citocinas inflamatórias quando comparados aos monócitos coletados de placentas não-infectadas, e que o aumento nos níveis de MIF no microambiente placentário ajuda na eliminação do parasito (CHSAVANEEYAKORN et al., 2002). Nossos resultados mostraram que células THP-1 não-estimuladas e infectadas produziram mais MIF do que células THP-1 infectadas após terem sido estimuladas com sobrenadante de células BeWo, infectadas ou não-infectadas, sugerindo que células trofoblásticas, mesmo quando infectadas com *T. gondii*, induzem monócitos infectados a secretarem menos MIF, diminuindo a resposta inflamatória. Estes resultados são favoráveis tanto para o controle do parasito quanto para a manutenção da gestação, uma vez que MIF em grandes quantidades é prejudicial para o curso gestacional, mas que, em concentrações adequadas, parece induzir resposta inflamatória capaz de promover proteção contra infecções e assegurar rápida e eficiente eliminação de parasitos (CHSAVANEEYAKORN et al., 2002).

A interleucina-12 (IL-12) tem a capacidade de estimular a produção de IFN- γ e TNF- α e ativar linfócitos citotóxicos em casos de infecções, sendo, portanto, uma das principais citocinas envolvidas no controle de patógenos intracelulares (EVERING, WEISS, 2006). No presente estudo demonstramos que células THP-1 não-infectadas secretaram níveis basais de IL-12 e, quando estimulados com sobrenadante de células BeWo não-infectadas, o perfil de secreção de IL-12 não foi alterado. Assim, células BeWo, por si só, não foram capazes de alterar a produção de IL-12 por monócitos. Entretanto, quando células THP-1 foram estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas, secretaram quantidades elevadas de IL-12, sugerindo que a presença do parasito em células trofoblásticas induz essas células a secretarem fatores que ativam os monócitos e os estimulam a secretar IL-12. Este resultado é reforçado quando se analisa as assinaturas das citocinas, em que se observa que a presença do sobrenadante de células BeWo infectadas faz com que IL-12 se torne uma citocina significativamente freqüente em células THP-1 estimuladas com tal sobrenadante. Estes resultados demonstram a importância da comunicação que se estabelece entre células trofoblásticas e células da imunidade inata presentes no microambiente da placenta.

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pleiotrópica e de difícil classificação como pró- ou anti-inflamatória. É descrita como pró-inflamatória, principalmente por se apresentar mais elevada nas fases iniciais de uma infecção (PASSOS et al., 2010). Entretanto, alguns estudos relacionaram níveis elevados de IL-6 com a supressão de processos inflamatórios, permitindo classificá-la como uma citocina anti-inflamatória (TILG; DINARELLO; MILLER, 1997; STEENSBERG et al., 2003).

Durante a gestação, IL-6 tem grande importância mostrando-se capaz de regular a produção de gonadotrofina coriônica humana (hCG) e de hormônio lactogênico placentário (hPL) (STEPHANOU; HANDWERGER, 1994). Além disso, trabalhos anteriores demonstraram a importância de IL-6 na implantação e nos estágios iniciais da gestação, uma

vez que, camundongos deficientes em IL-6 apresentaram fertilidade reduzida e tiveram implantação comprometida (ROBERTSON; O'CONNELL; RAMSEY, 2000). Interleucina-6 também é capaz de interferir no crescimento fetal, por sua capacidade de controlar a transferência de nutrientes e gases e interferir na permeabilidade vascular (DESAI et al., 2002; JONES; JANSSON; POWELL, 2009; KENDALL, PEEBLES, 2005).

O presente trabalho demonstrou que células THP-1 infectadas ou não-infectadas, quando estimuladas com sobrenadantes de células trofoblásticas BeWo, infectadas ou não, secretaram níveis maiores de IL-6 do que células THP-1 não-estimuladas. Sabendo-se que esta citocina pode facilitar o crescimento e invasão do trofoblasto através da decídua (FEST et al., 2007), este resultado sugere que células trofoblásticas estimulam a secreção de IL-6 pelos monócitos, e estes, por sua vez, exercem um papel modulador no sítio de implantação, promovendo sinais apropriados que facilitam a implantação e invasão trofoblástica.

Interleucina-6 também pode exercer papel importante na defesa contra patógenos, uma vez que tem a capacidade de atrair e ativar células imunes efetoras na interface materno-fetal (FUJISAWA et al., 2000). Nossos resultados mostraram que a secreção de IL-6 foi maior em células THP-1 infectadas, principalmente nos casos em que essas células foram pré-estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas, sugerindo que o parasito estimula a liberação de componentes capazes de intensificar a ação do trofoblasto sobre os monócitos e que esta maior produção de IL-6 possa ser um mecanismo de defesa do próprio hospedeiro.

Estudos prévios demonstraram que monócitos estimulados com sobrenadante de células trofoblásticas e desafiados com altas doses de LPS (10 μ g), secretaram quantidades significativamente maiores de IL-6 do que monócitos desafiados e não-estimulados. Entretanto, o mesmo não foi verificado quando os monócitos foram desafiados com baixas doses de LPS (0.1 μ g) (FEST et al., 2007). Percebe-se, portanto, que células trofoblásticas podem modular a ação dos monócitos de diferentes formas propiciando o sucesso da gestação.

A secreção da citocina pró-inflamatória IL-17A foi mais significativa nas condições em que células THP-1 foram infectadas, ressaltando sua importância no controle do parasitismo. Este padrão de secreção foi modulado por células trofoblásticas, uma vez que células THP-1 infectadas após estímulo com sobrenadante de células BeWo não-infectadas apresentaram secreção diminuída de IL-17A; já células THP-1 infectadas após estímulo com sobrenadante de células BeWo infectadas, apresentaram níveis mais elevados de IL-17A, sugerindo que o parasito é capaz de ativar mecanismos em células trofoblásticas que modulam, direta ou indiretamente, o padrão de secreção de IL-17A por células THP-1 infectadas com *T. gondii*.

No presente trabalho também analisamos a secreção das citocinas anti-inflamatórias TGF- β 1 e IL-10 por células THP-1 estimuladas e não-estimuladas com sobrenadante de células trofoblásticas BeWo. As citocinas TGF- β e IL-10 são citocinas reguladoras essenciais para a tolerância do conceito nos estágios iniciais da gestação (SCHÄFER-SOMI, 2003; ROBERTSON et al., 2009) e são capazes de deslocar a resposta imune para um perfil de citocinas anti-inflamatórias ou reguladoras. Estas citocinas têm a capacidade de gerar um local imunologicamente privilegiado para o desenvolvimento fetal, inibindo a atividade de células NK e de células produtoras de citocinas inflamatórias (JONES et al., 2006). Em contrapartida, apesar de favorecerem o sucesso gestacional, citocinas de perfil Th2 ou T reguladoras tornam o ambiente placentário potencialmente mais susceptível a infecção, manutenção e disseminação de patógenos (NAGINENI; DETRICK; HOOKS, 2002; BARBOSA et al., 2008). Entretanto, estudos recentes demonstraram que TGF- β pode atuar na via de produção e ativação de IL-17 (PASSOS et al., 2010) e assim, a presença de TGF- β , ao mesmo tempo em que torna o organismo mais susceptível à infecção, estimula a liberação de fatores que podem controlar essa mesma infecção.

No presente estudo demonstramos que células THP-1 infectadas secretaram menos TGF- 1 do que aquelas não-infectadas e essa diminuição foi maior nos casos em que essas células foram estimuladas com os sobrenadantes de células BeWo infectadas. Esses resultados sugerem que, de forma geral, células BeWo regulam negativamente a secreção de TGF- 1 pelos monócitos e na presença de *T. gondii* esta modulação é intensificada.

A citocina IL-10 também foi secretada em níveis menores pelo grupo de células THP-1 infectadas em relação ao grupo não-infectado. Entretanto, células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo, principalmente sobrenadante de células previamente infectadas, secretaram mais IL-10 do que células não estimuladas. Juntos, estes resultados sugerem que, quando células THP-1 são infectadas, a secreção de IL-10 é menor porque citocinas pró-inflamatórias são produzidas para controlar a infecção, e dessa forma, as citocinas anti-inflamatórias são reguladas negativamente. Porém, células trofoblásticas são hábeis em secretar fatores que estimulam os monócitos a secretarem IL-10 e este evento pode ser exacerbado pela presença do parasito nas células trofoblásticas, promovendo, dessa forma, o estabelecimento de um microambiente menos inflamatório, adequado a uma situação de gestação.

Células THP-1 que foram infectadas após estímulo com sobrenadante de células BeWo, principalmente de células BeWo previamente infectadas, controlaram mais a proliferação de *T. gondii* do que células não-estimuladas e infectadas. Estes resultados indicam que o trofoblasto é capaz de modular a ação dos monócitos tornando-os mais resistentes à infecção por *T. gondii*. Existe uma associação entre os níveis de IL-6 e o parasitismo em células THP-1. Assim, situações de menor parasitismo em células THP-1 coincidem com níveis mais elevados de secreção de IL-6 por estas células; já níveis mais baixos de secreção de IL-6 por células THP-1 coincidem com maior parasitismo nesta

população celular. Estes achados sugerem fortemente que IL-6 tenha participação efetiva no controle de *T. gondii* em células THP-1.

A importância de IL-6 no controle do parasitismo foi confirmada uma vez que, ao tratar células THP-1 com a citocina recombinante, o nível do parasitismo diminuiu e, ao se tratar essas células com anti-IL-6 o parasitismo aumentou. Dessa forma, no modelo experimental analisado neste estudo, IL-6 mostrou estar envolvida no controle da proliferação de *T. gondii*.

Corroborando com nossos resultados, estudos anteriores demonstraram que camundongos IL6^{-/-} e infectados com *T. gondii* falharam no desenvolvimento de resposta pró-inflamatória inata, a qual é essencial para limitar a replicação do parasito (JEBBARI et al., 1998). Suzuki et al. (1997) usaram camundongos geneticamente deficientes em IL-6 e também demonstraram efeito protetor de IL-6 em casos de encefalites decorrentes de infecções com *T. gondii*. Dentre as diferentes formas que IL-6 pode atuar controlando a infecção pelo parasito, destaca-se sua possível capacidade de estimular a produção da citocina pró-inflamatória IFN- γ , uma vez que na ausência de IL-6, camundongos apresentaram produção de IFN- γ comprometida (JEBBARI et al., 1998). Outros estudos mostraram que IL-6 induz a produção de IL-17 por células do sistema imune inato, uma vez que camundongos deficientes na atividade de linfócitos e infectados com *T. gondii*, quando estimulados com IL-6 secretaram mais IL-17 do que camundongos não-estimulados (PASSOS et al., 2010). IL-6 também já foi descrita como uma citocina importante para o controle da disseminação de infecções com *Giardia duodenalis* (KAMDA; NASH; SINGER, 2012), na resposta imune protetora contra *Trypanosoma cruzi* (GAO; PEREIRA, 2002) e na limitação da multiplicação microbiana durante infecção com *Listeria monocytogenes* (KOPF et al., 1994, DALRYMPLE et al., 1995), *Vaccinia vírus* (KOPF et al., 1994) e *Candida albicans* (ROMANI et al., 1996).

Estudos prévios demonstraram que IL-6, além de exercer papel importante na iniciação de processos inflamatórios em casos de infecções, é essencial na resolução desta mesma inflamação (TILG; DINARELLO; MILLER, 1997), uma vez que, IL-6 pode estimular a secreção da citocina reguladora IL-10 (STEENSBERG et al., 2003). Este fenômeno ocorre, provavelmente, pelo fato de que a secreção de ambas as citocinas, IL-6 e IL-10, é controlada pela mesma via de sinalização, via STAT3 (CHEON et al., 2006, MULLA et al., 2010). Assim, quando o sistema imune é estimulado a secretar IL-6, pode haver uma secreção concomitante de IL-10, e, juntas, essas citocinas podem balancear a intensidade da resposta imune. Esta importante relação foi observada em estudos com *Plasmodium falciparum*, em que altas concentrações de IL-6 em decorrência de deficiências na produção de IL-10 foram responsáveis por quadros fatais de malária (PERLMANN; TROYE-BLOMBERG, 2002).

Finalmente, por meio dos resultados referentes ao parasitismo em células THP-1 estimuladas com sobrenadante neutralizado de células BeWo, verificou-se que, dentre outros fatores envolvidos, as citocinas IL-6 e MIF, secretadas por células BeWo, foram capazes de modular a atividade funcional de células THP-1, tornando-as mais resistentes à infecção por *T. gondii*. Entretanto, TGF- 1 secretado por células trofoblásticas não foi capaz de modular a atividade funcional de células THP-1 no controle da infecção. Estudos recentes demonstraram que os macrófagos decíduais podem ser de dois tipos, dependendo do microambiente em que estão inseridos. Macrófagos ativados por citocinas pró-inflamatórias são classificados como macrófagos tipo 1 e secretam citocinas que participam da progressão da inflamação, como TNF- e IL-12. Macrófagos ativados por citocinas anti-inflamatórias são classificados como macrófagos M2 e desempenham papel essencial na tolerância imune durante a gestação (NAGAMATSU, SCHUST, 2010). Assim, nossos achados reforçam que fatores solúveis secretados por células trofoblásticas podem modular a atividade funcional de monócitos e sua conseqüente diferenciação em macrófagos do tipo M1 ou M2.

Em conjunto, os nossos dados aqui apresentados, demonstraram pela primeira vez que células trofoblásticas BeWo são hábeis em modular a atividade funcional de células THP-1 e modificar o padrão de secreção de citocinas por essas células do sistema imune inato, na presença ou ausência de *T. gondii*. Coletivamente, os eventos por nós observados *in vitro* permitem sugerir que fenômenos semelhantes possam ocorrer *in vivo*, com células trofoblásticas alterando a função de monócitos na interface materno-fetal e controlando a resposta imune no microambiente placentário.

Assim, nossos achados adicionam importantes dados para a compreensão de um intrigante evento biológico de comunicação celular e modulação da resposta imune inata que se estabelece em uma gestação de sucesso e em casos de infecções concomitantes à gestação. Estes resultados sugerem que, embora vários outros componentes, celulares ou não, também atuem simultaneamente para assegurar o sucesso da gestação e defender o organismo hospedeiro de infecções por patógenos, esse processo depende intimamente de um delicado balanço entre células imunes inatas e células trofoblásticas. Dessa forma, casos de abortos, abortos recorrentes, partos prematuros, complicações gestacionais e infecções congênitas podem ser decorrentes de uma falha nesta comunicação celular.

7. CONCLUSÕES

- Células THP-1 e BeWo infectadas com *T. gondii* apresentam perfil de resposta imune pró-inflamatória, com secreção de níveis mais elevados das citocinas pró-inflamatórias (MIF, IL-12, IL-6 e IL-17A) e diminuição da secreção das citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF-1);
- Células BeWo alteram a secreção de citocinas por células THP-1, na presença ou ausência de *T. gondii*;
- Células THP-1 estimuladas com sobrenadantes de células BeWo infectadas ou não-infectadas são menos susceptíveis à proliferação de *T. gondii*;
- A citocina IL-6 está envolvida no controle do parasitismo em células THP-1 infectadas com *T. gondii*;
- Interleucina-6 e MIF, mas não TGF- 1, secretados por células BeWo estão envolvidos no controle do parasitismo em células THP-1.

8. FIGURAS

Figura 1

THP-1

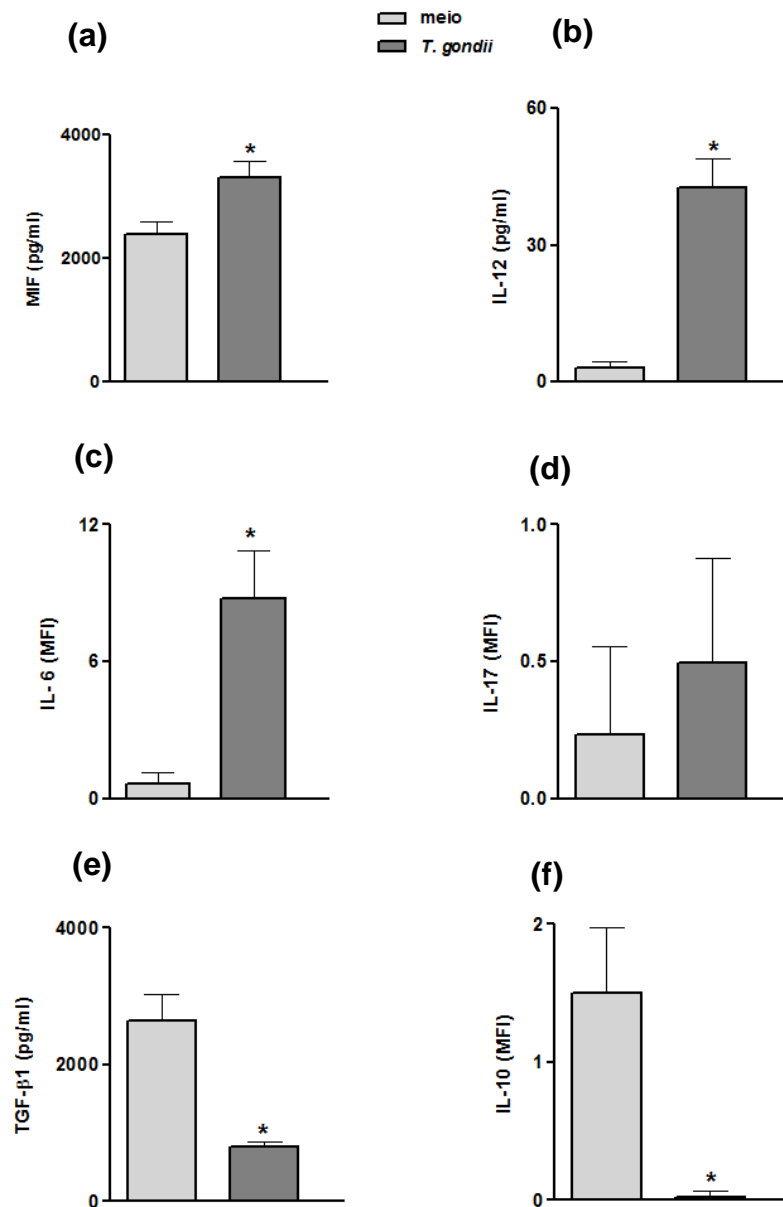


Figura 1: Secreção de citocinas por células THP-1 não-infectadas e infectadas com *T. gondii*. (a) MIF, (b) IL-12, (c) IL-6, (d) IL-17A, (e) TGF-β1, (f) IL-10. Os resultados estão expressos em pg/ml quando a dosagem foi realizada por ELISA e em MFI (intensidade média de fluorescência) quando a metodologia utilizada foi a citometria de fluxo. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ (teste t de Student).

Figura 2

BeWo

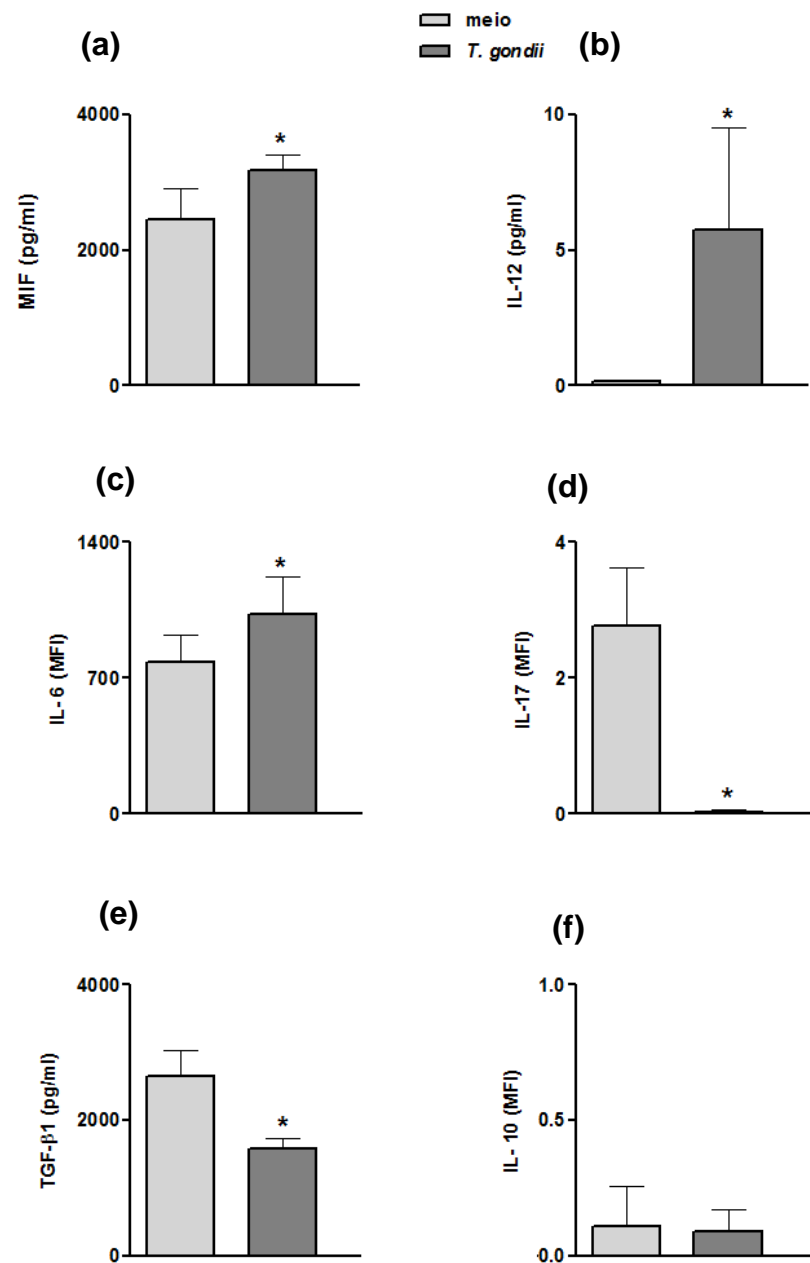


Figura 2: Secreção de citocinas por células BeWo não-infectadas e infectadas com *T. gondii*. (a) MIF, (b) IL-12, (c) IL-6, (d) IL-17A, (e) TGF-β1, (f) IL-10. Os resultados estão expressos em pg/ml quando a dosagem foi realizada por ELISA e em MFI (intensidade média de fluorescência) quando a metodologia utilizada foi a citometria de fluxo. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ (teste t de Student).

Figura 3

Figura 3: Assinaturas das citocinas secretadas por células THP-1 e BeWo não-infectadas ou infectadas por *T. gondii*. Os resultados estão expressos em frequência de citocinas (%) calculada a partir das medianas globais para cada citocina. As medianas globais para as citocinas secretadas por células BeWo foram: IL-6 = 900,985 MFI; IL-10 = 0,055 MFI; IL-17A = 0,805 MFI; MIF = 2854,992 pg/ml; IL-12 = 1,617 pg/ml e TGF- 1 = 2042,466 pg/ml; para citocinas secretadas por células THP-1 as medianas foram: IL-6 = 27,03 MFI; IL-10 = 1,05 MFI; IL-17A = 0,12 MFI; MIF = 2529,55 pg/ml; IL-12 = 20,95 pg/ml e TGF- 1 = 1132,82 pg/ml. Frequências superiores a 50% foram consideradas estatisticamente significantes. As citocinas agrupadas apresentaram frequência superior a 50% e aquelas em destaque representam as citocinas que não foram frequentes em todas as condições experimentais.

Figura 4

THP-1

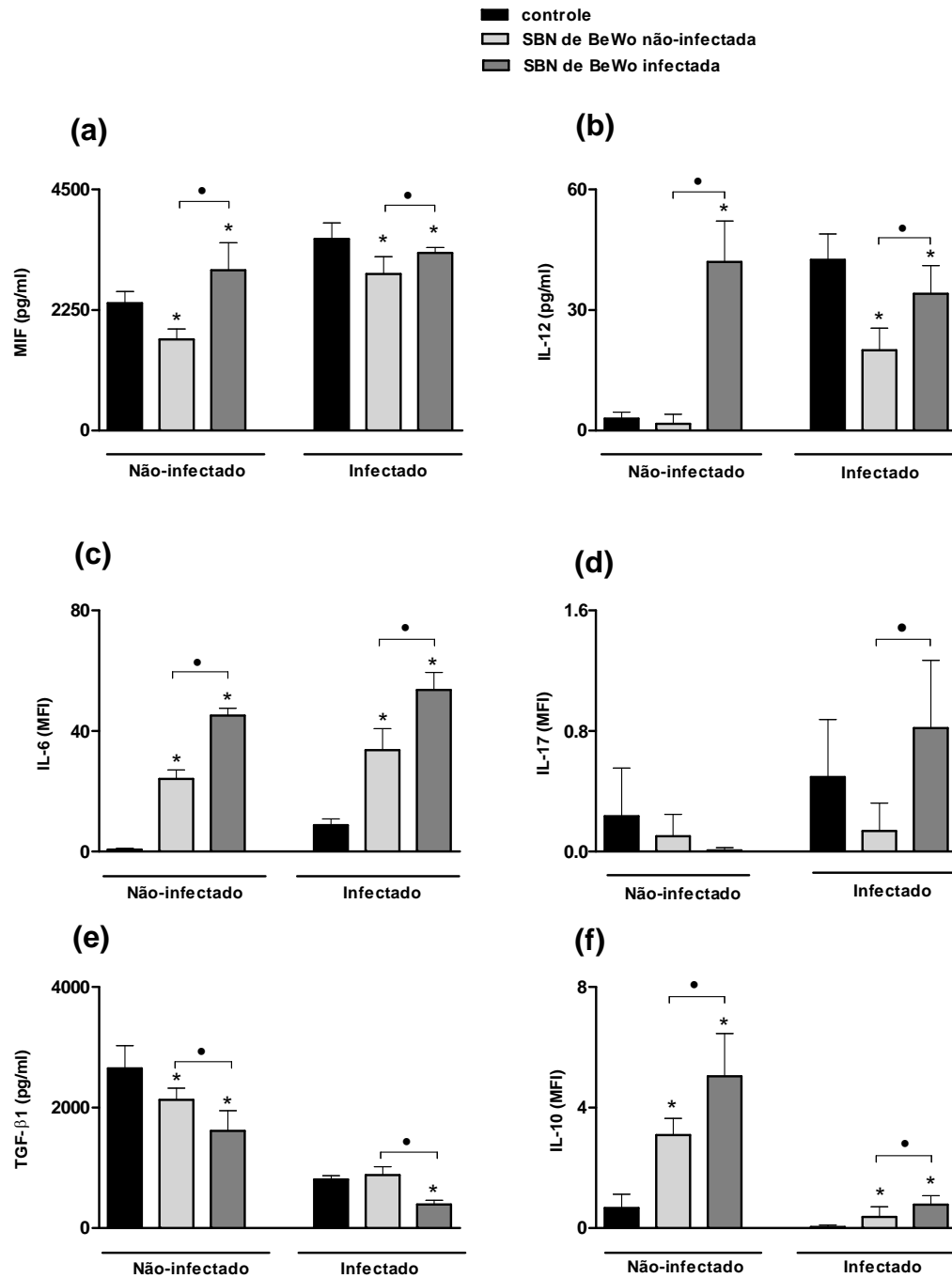


Figura 4: Secção de citocinas por células THP-1 estimuladas com sobrenadantes (SBN) de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*. (a) MIF, (b) IL-12, (c) IL-6, (d) IL-17A, (e) TGF- 1, (f) IL-10. Os resultados estão expressos em pg/ml quando a dosagem foi realizada por ELISA e em MFI (intensidade média de fluorescência) quando a metodologia utilizada foi a citometria de fluxo. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (teste t de Student). (*) Células THP-1 estimuladas com sobrenadantes de células BeWo não-infectadas ou infectadas comparadas ao controle (THP-1 + meio); () células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas comparadas às células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas.

Figura 5

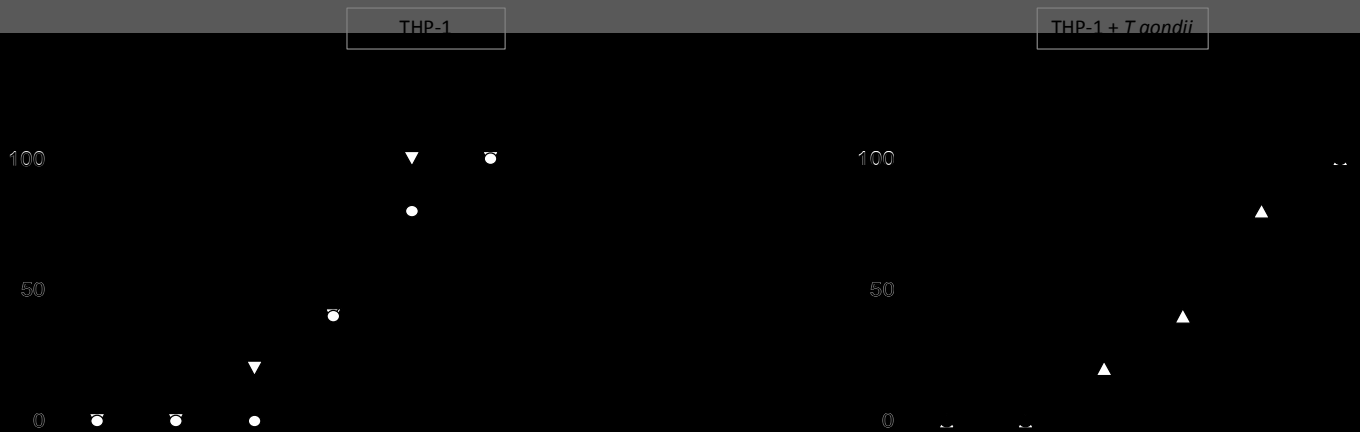


Figura 5: Assinaturas das citocinas secretadas por células THP-1 não-infectadas ou infectadas por *T. gondii* e estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*. Os resultados estão expressos em frequência de citocinas (%) calculada a partir das medianas globais para cada citocina. As medianas globais para as citocinas secretadas por células BeWo foram: IL-6 = 900,985 MFI; IL-10 = 0,055 MFI; IL-17A = 0,805 MFI; MIF = 2854,992 pg/ml; IL-12 = 1,617 pg/ml e TGF-1 = 2042,466 pg/ml; para citocinas secretadas por células THP-1 as medianas foram: IL-6 = 27,03 MFI; IL-10 = 1,05 MFI; IL-17A = 0,12 MFI; MIF = 2529,55 pg/ml; IL-12 = 20,95 pg/ml e TGF-1 = 1132,82 pg/ml. Frequências superiores a 50% foram consideradas estatisticamente significantes. As citocinas agrupadas apresentaram frequência superior a 50% e aquelas em destaque representam as citocinas que não foram frequentes em todas as condições experimentais.

Figura 6

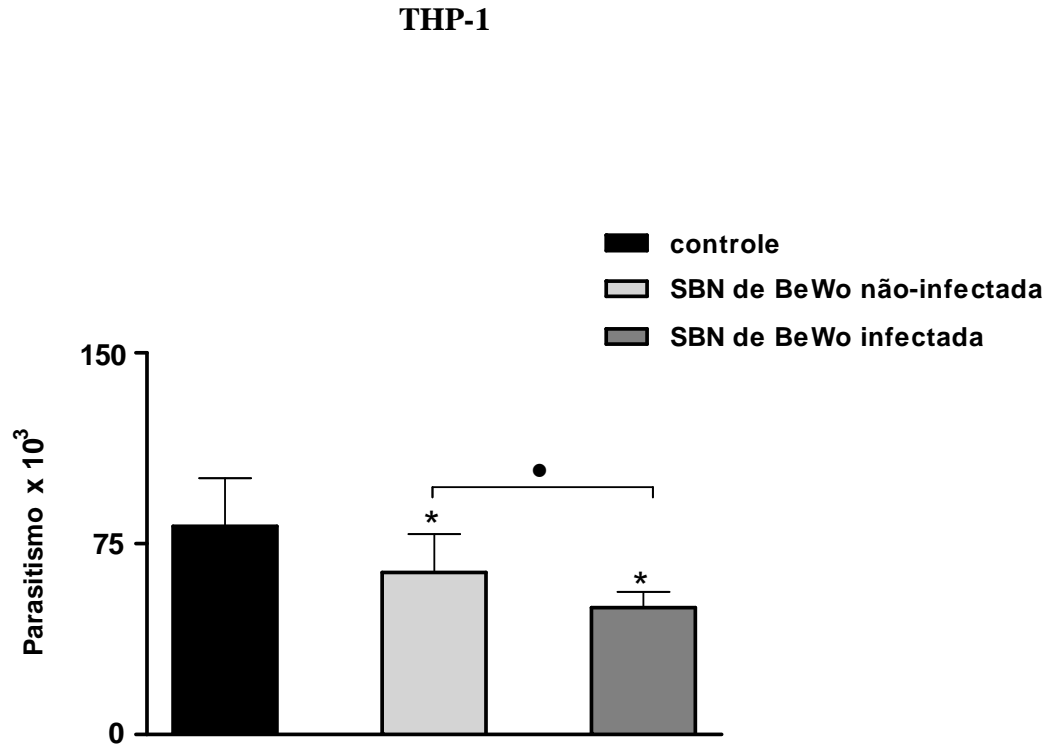


Figura 6: Índice de parasitismo de *T. gondii* em células THP-1 estimuladas com sobrenadantes de células BeWo não-infectadas ou infectadas. Os dados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (teste t de *Student*). (*) Células THP-1 estimuladas com os diferentes sobrenadantes comparadas ao controle (células THP-1 não-estimuladas); () comparação entre células THP-1 estimuladas com sobrenadantes de células BeWo infectadas e células THP-1 estimuladas com sobrenadantes de células BeWo não-infectadas.

Figura 7

THP-1

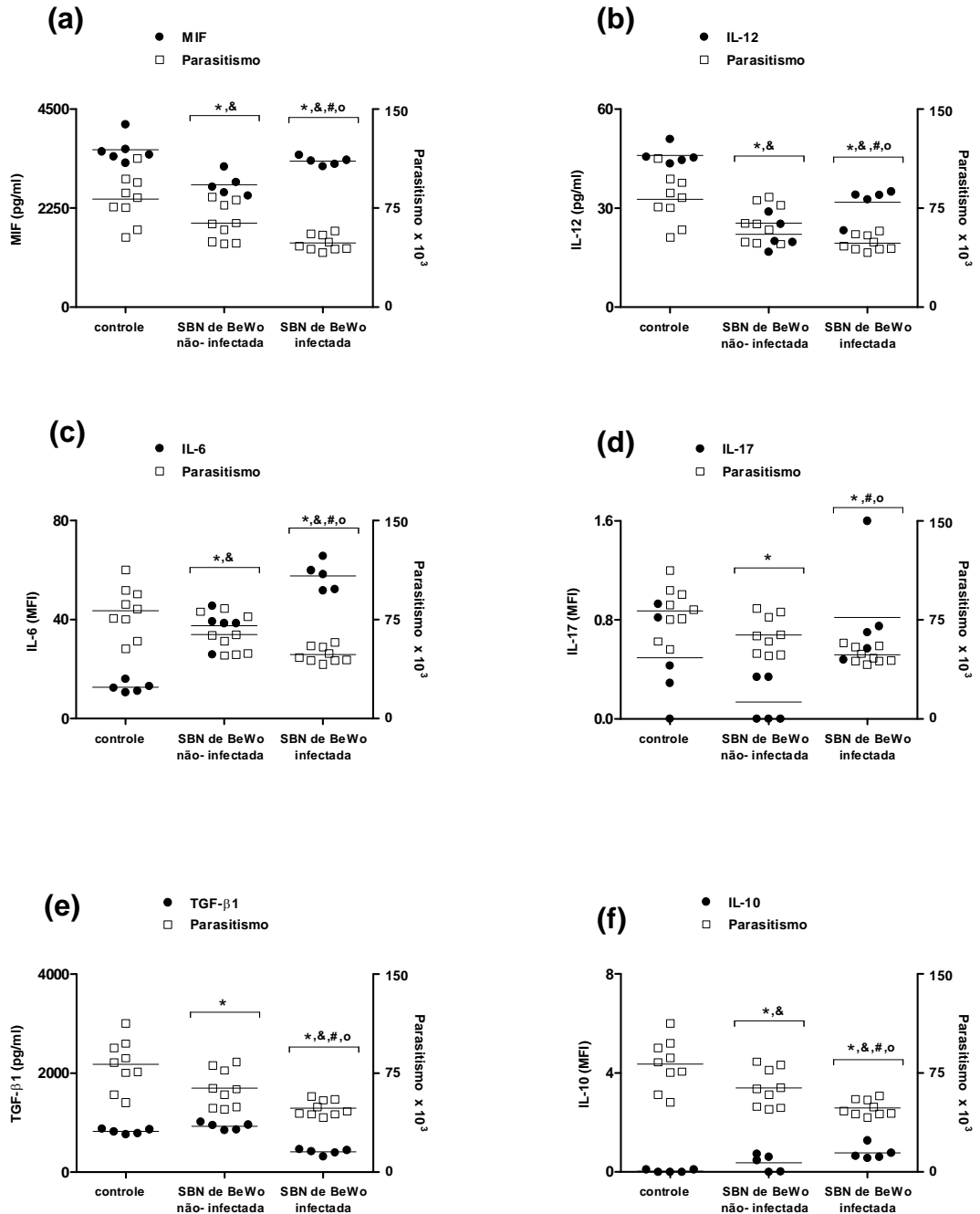


Figura 7: Associação entre a secreção de citocinas por células THP-1 e o índice de parasitismo nestas mesmas células estimuladas ou não-estimuladas com sobrenadante (SBN) de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (teste t de Student). (*) Índice de parasitismo em células THP-1 estimuladas comparado ao controle; (&) secreção de citocinas por células THP-1 estimuladas com os diferentes sobrenadantes comparada ao controle; (#) índice de parasitismo em células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas quando comparado às células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas; (o) secreção de citocinas por células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo infectadas comparada às células THP-1 estimuladas com sobrenadante de células BeWo não-infectadas. As barras horizontais representam os valores médios de produção de citocinas e parasitismo.

Figura 8

THP-1

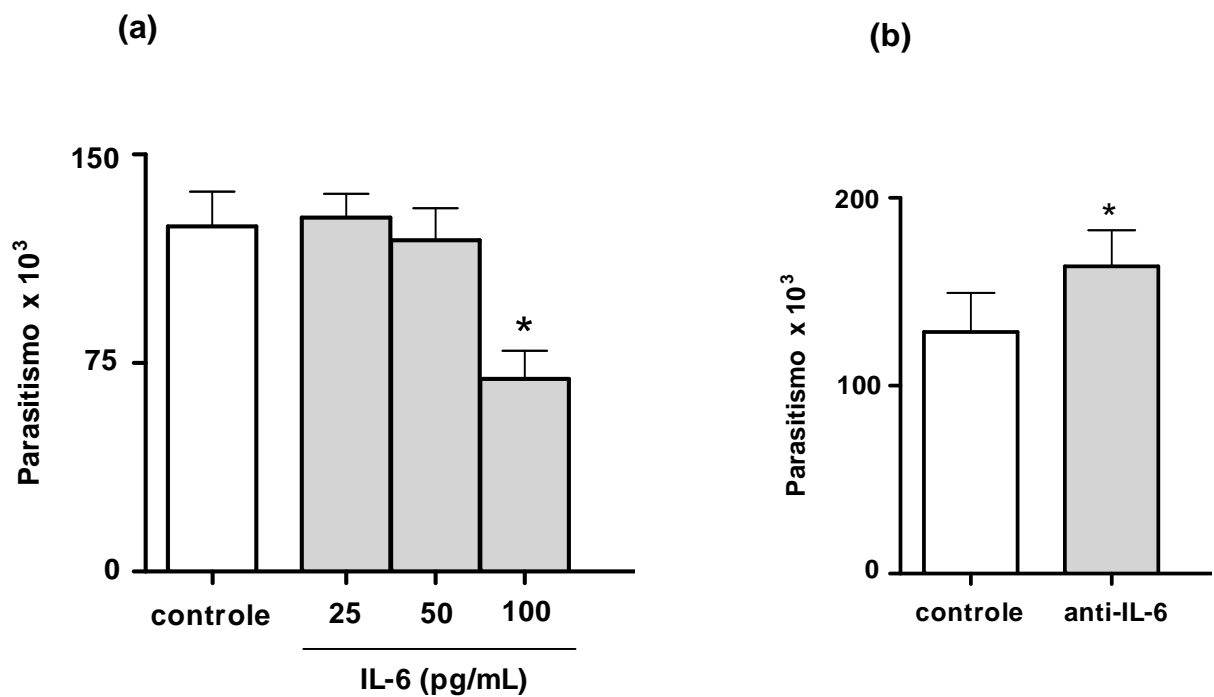


Figura 8: (a) Índice de parasitismo em células THP-1 tratadas com rIL-6 em três concentrações diferentes (25 pg/ml, 50 pg/ml, 100 pg/ml). Os dados são representativos de 2 experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. (*) Células THP-1 tratadas com rIL-6 comparadas ao controle. (b) Índice de parasitismo em células THP-1 tratadas com anti-IL-6 (10 g/ml). Os dados são representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. (*) Células THP-1 tratadas com anti-IL-6 comparadas ao controle.

Figura 9

THP-1

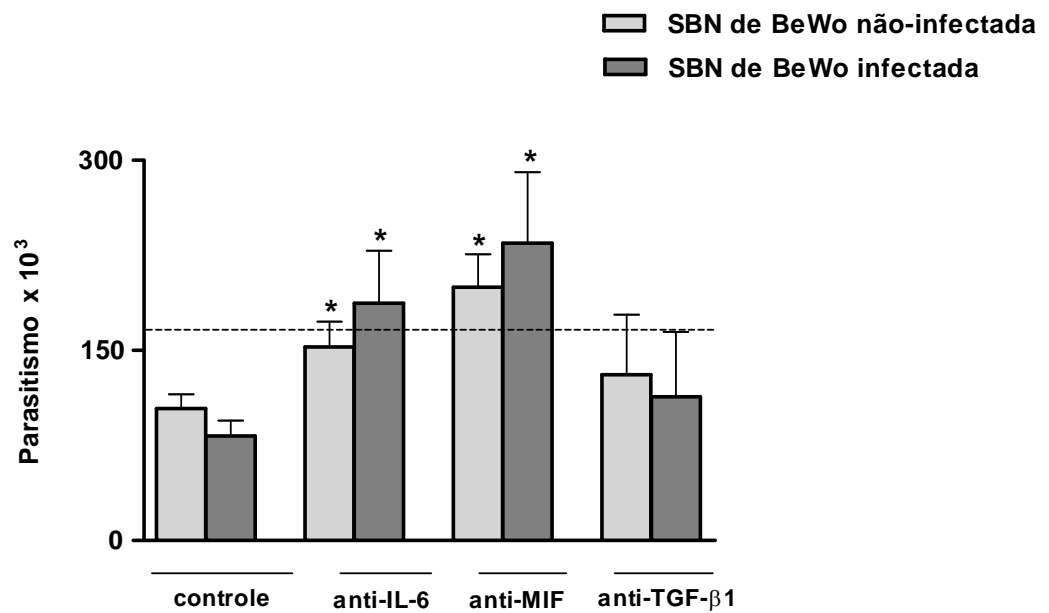


Figura 9: Índice de parasitismo em células THP-1 tratadas com sobrenadantes neutralizados de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*. Os sobrenadantes foram neutralizados, separadamente, com anti-IL-6, anti-MIF e anti-TGF-1 em uma concentração de 10 g/ml. Os dados são representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças estatística foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. (*) Células THP-1 estimuladas com sobrenadantes neutralizados de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii* comparadas ao controle (células THP-1 estimuladas com sobrenadantes não-neutralizados de células BeWo não-infectadas ou infectadas com *T. gondii*). A linha tracejada representa a condição de células THP-1 infectadas com *T. gondii* sem nenhum tipo de estímulo.

Figura 10

THP-1

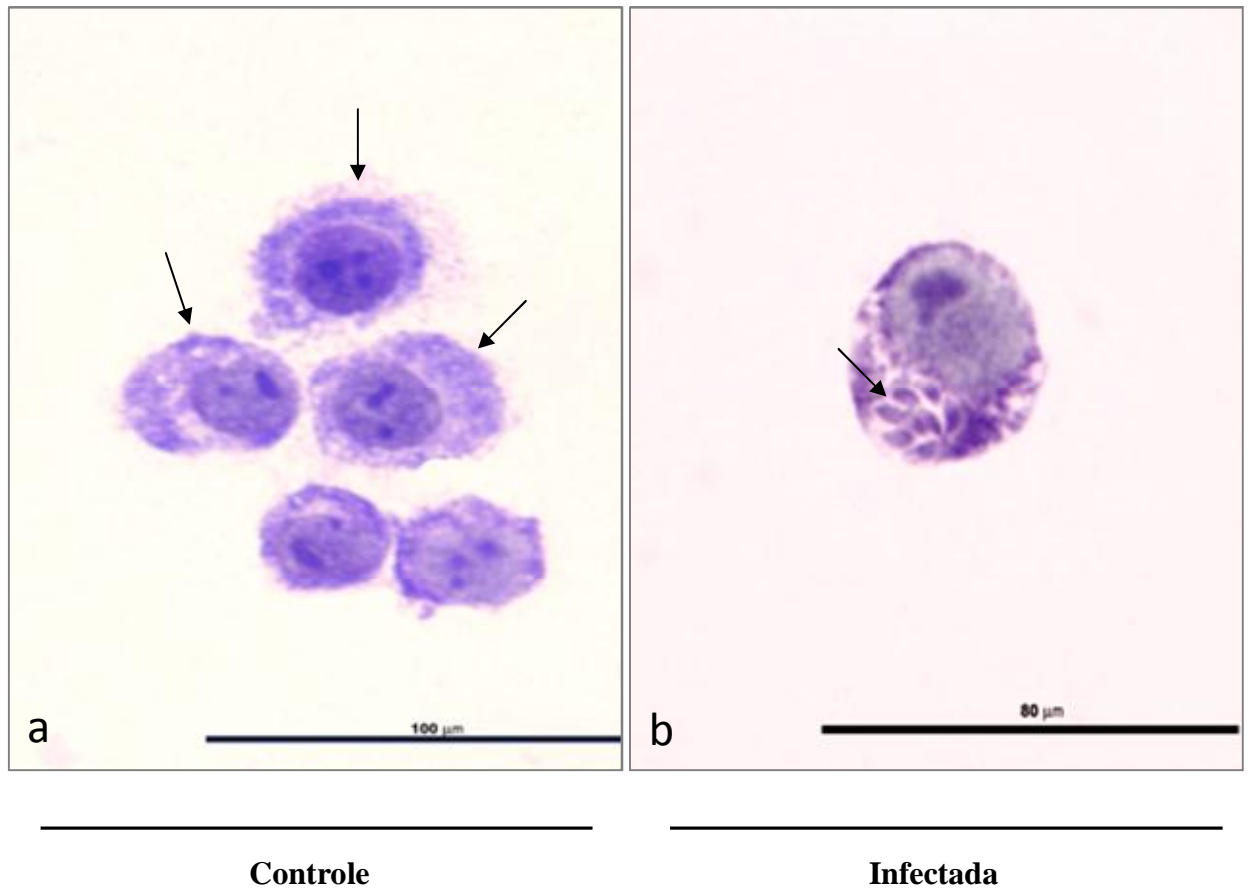


Figura 10: Fotomicrografias de células THP-1 não-infectadas e infectadas com *T. gondii*. As células foram fixadas e coradas com azul de toluidina. **(a)** Células THP-1 não-infectadas. As setas evidenciam o formato global característico da célula e sua capacidade de crescer em grupos em cultura celular. **(b)** Células THP-1 infectadas com *T. gondii*. A seta destaca o vacúolo parasitóforo com taquizoítas em seu interior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 of primary infection. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 3, p. 1397-1401, Mar., 2004.

ABRAHAMS V.M.; VISINTIN, I.; ALDO, P.B.; GULLER, S.; ROMERO R.; MOR G. A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells. **J. Immunol.**, v. 175, n. 12, p. 8096-8104, Dec., 2005.

AJZENBERG, D.; COGNÈ, N.; PARIS, L.; BESSIÈRES, M.; THULLIEZ, P.; FILISETTI, D.; PELLOUX, H.; MARTY, P.; DARDÈ, M. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. **J. Infect. Dis.**, v. 186, n. 5, p. 684-9, Sep., 2002.

AJZENBERG, D. Type I strains in human toxoplasmosis: myth or reality? **Future Microbiol.**, v. 5, n. 6, p. 841-843, Jun., 2010.

AKBAR AN, VUKMANOVIC-STEJIC M, TAAMS LS, MACALLAN DC: The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 3, p. 231-237, Mar., 2007.

ANGELONI, M.B.; SILVA, N.M.; CASTRO, A.S.; GOMES, A.O.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo trophoblastic and HeLa cells are differentially modulate by *Toxoplasma gondii* strains type. **Placenta**, v. 30, p. 785-791, Sep., 2009.

BARBOSA, B.F.; SILVA, D.A.; COSTA, I.N.; PENA, J.D.; MINEO, J.R.; FERRO, E. A. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in Camomys callosus. **Placenta**, v. 28, n. 7, p. 624-630, Dec., 2007.

BARBOSA B.F.; SILVA D.A.; COSTA I.N.; MINEO J.R.; FERRO E.A. BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferon-gamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta1. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 151, n. 3, p. 536-545, Mar., 2008.

BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. **Trends. Microbiol.**, v. 11, n. 9, p. 426-430, Sep., 2003.

BARRAGAN, A.; BROSSIER, F.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. **Cell. Microbiol.**, v. 7, n. 4, p. 561-568, Apr., 2005.

BARRAGAN, A.; HITZIGER, N. Transepithelial migration by *Toxoplasma gondii*. **Subcell. Biochem.**, v. 47, p. 198-207, 2008.

BLADER, I.J.; SAEIJ, J.P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS**, v. 117, p. 458-476, May., 2009.

BOOTHROYD, J.C.; GRIGG, M.E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 5, n. 4, p. 438-42, Aug., 2002.

BOOTHROYD, J.C.; DUBREMETZ, J. Kiss and spit: the dual role of *Toxoplasma* rhoptries. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, n. 1, p. 79-88, Jan., 2008.

BRADLEY, P.J.; SIBLEY, L.D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factor. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 10, n. 6, p. 582-7, Dec., 2007.

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.**, v. 174, n. 6, p. 3148-52, Mar., 2005.

CARRUTHERS, V.B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Trop.**, v. 81, n. 2, p. 111-22, Feb., 2002.

CARRUTHERS, V.B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Trop.**, v. 81, n. 2, p. 111-122, Feb., 2006.

CARRUTHERS, V.B.; BOOTHROYD, J.C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 10, n. 1, p. 83-89, Feb., 2007.

CHSAVANEEYAKORN, S.; MOORE, J.M.; OTHORO, C.; OTIENO, J.; CHAIYAROJ, S.C.; SHI, Y.P.; NAHLEN, B.L.; LAL, A.A.; UDHAYAKUMAR V. Immunity to placental malaria: IV. Placental malaria is associated with up-regulation of macrophage migration inhibitory factor in intervillous blood. **J. Infect. Dis.** v. 186, n. 9, p. 1371-1375, Nov., 2002.

CHANNON, J.Y.; SEGUIN, R.M.; KASPER, L.H. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 8, p. 4822-4826, Aug, 2000.

CHAOUAT, G.; LEDEE-BATAILLE, N.; DUBANCHET, S.; ZOURBAS, S.; SANDRA, O.; MARTAL, J. Reproductive immunology 2003: reassessing the Th1/Th2 paradigm? **Immunol. Lett.**, v. 92, n. 3, p. 207-214, Apr., 2004.

CHEMLA, C.; VILLENA, I. ; AUBERT, D. ; HORNOY, P. ; DUPOUY, D. ; LEROUX, B.; BORU, J. P.; PINON, J. M. Preconception seroconversion and maternal seronegativity at delivery do not rule out the risk of congenital toxoplasmosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 2, p. 489-490, Mar., 2002.

CHEN, K.T.; ESKILD, A.; BRESNAHAN, M.; STRAY-PEDERSEN, B.; SHER, A.; JENUM, P.A. Previous maternal infection with *Toxoplasma gondii* and the risk of fetal death. **Am. J. of Obstet. and Gynecol.**, v. 193, n. 2, p. 443-449, Aug., 2005.

CHEON, H.; RHO, Y.H.; CHOI, S.J.; LEE, Y.H.; SONG, G.G.; SOHN, J.; WON, N. H.; JI, J.D. Prostaglandin E2 augments IL-10 signaling and function. **J. Immunol.**, v. 177, n. 2, p. 1092-1100, Jul., 2006.

COMBE, C.L.; CURIEL, T.J.; MORETTO, M.M.; KHAN, I.A. NK cells help to induce CD8⁺-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4⁺ T cells. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 8, p. 4913-21, Aug., 2005.

COPPENS, L.; DUNN, J.D.; ROMANO, J.D.; PYPAERT, M.; ZHANG, H.; BOOTHROYD, J.C.; JOINER, K.A. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. **Cell.**, v. 125, n. 2, p. 261-274, Apr., 2006.

COSTELLO, M.J.; JOYCE, S.K.; ABRAHAMAS, V.M. NOD protein expression and function in first trimester trophoblast cells. **Am. J. Reprod. immunol.**, v. 57, n. 1, p. 67680, Jan., 2007.

COURRET, N.; DARCHE, S.; SONIGO, P.; MILON, G.; BUZONI-GATEL, D.; TARDIEUX, I. CD11c and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 309-316, Jan., 2006.

DALRYMPLE, S.A.; LUCIAN, .L.A.; SLATTERY, R., MCNEIL, T., AUD, D.M.; FUCHINO, S., LEE, F., MURRAY, R. Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 6, p. 2262-2268, Jun., 1995.

DENKERS, E.Y.; GAZZINELLI, R.T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clin. Microbiol.**, v. 11, n. 4, p. 569-588, Out., 1998.

DENKERS, E.Y. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 39, n. 3, p. 193-203, Dec., 2003.

DENKERS, E.Y. Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*. **J. Biom. Biotechnol.**, v. 2010, n. 11, p. 1-7, Nov., 2009.

DESAI, T.R.; LEEPER, N.J.; HYNES, K.L.; GEWERTZ, B.L. Interleukin-6 causes endothelial barrier dysfunction via the protein kinase C pathway. **J. Surg. Res.**, v. 104, n. 2, p. 118-123, May., 2002.

DUBEY, J.P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, n. 7, p. 1019-24, Jul., 1998.

DUBEY, J.P.; Toxoplasmosis ó a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1-2, p. 57-72, Dec., 2004.

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

EVERING, T.; WEISS, L.M. The immunology of parasite infections in immunocompromised hosts. **Parasite Immunol.**, v. 28, n. 11, p. 549-565, Nov., 2006.

FERRO, E.A.V. Cinética da infecção congênita de células trofoblásticas por *Toxoplasma gondii* na placenta de *Calomys callosus*. 2000. 147f. Tese (Doutorado) ó Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

FEST, S.; ALDO, P.B.; ABRAHAMNS, V.M.; VISINTIN, I; ALVERO, A.; CHEN, R.; CHAVEZ, S.L.; ROMERO, R., MOR, G. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 57, n. 1, p. 55-66, Jan., 2007.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Ann. Inst. Super Sanita.**, v. 40, n. 1, p. 71-80, 2004.

FLORES M, SAAVEDRA R, BAUTISTA R, VIEDMA R, TENORIO EP, LENG L, SÁNCHEZ Y, JUÁREZ I, SATOSKAR AA, SHENOY AS, TERRAZAS LI, BUCALA R,

BARBI J, SATOSKAR AR, RODRIGUEZ-SOSA M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. **FASEB J.**, v. 22, n. 10, p. 3661-3671, Oct., 2008.

FUJISAWA, K.; NASU, K.; ARIMA, K.; SUGANO, T.; NARAHARA, H.; MIYAKAWA, I. Production of interleukin IL-6 and IL-8 by a choriocarcinoma cell line, BeWo. **Placenta**, v. 21, n. 4, p. 354-360, Mai., 2000.

GADDI, P.J.; YAP, G.S. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. **Immunol. Cell Biol.**, v. 85, n. 2, p. 155-9, Jan., 2007.

GAO, W.; PEREIRA, M.A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. of Parasitol.**, v. 32, n. 2, p. 167-170, Feb., 2002.

GOMES, A.O.; SILVA, D.A.O.; SILVA, N.M.; BARBOSA, B.F.; FRANCO, P.S.; ANGELONI, M.B.; FERMINO, M.L.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; BECHI, N.; PAULESO, L.R.; SANTOS, M.C.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A.V. Effect of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Human Placental Explants Infected with *Toxoplasma gondii* Depends on Gestational Age. **Am. J. Pathol.**, v. 178, n. 6, p. 2792-2801, Jun., 2011.

GUDE, N. M.; ROBERTS, C. T.; KALIONIS, B.; KING, R. G. Growth and function of the normal human placenta. **Thrombosis Research**, Elmsford, v. 114, n. 5-6, p. 397-407, 2004.

HANNA, J.; GOLDMAN-WOHL, D.; HAMANI, Y.; AVRAHAM, I.; GREENFIELD, C.; NATANSON-YARON, S.; PRUS, D.; COHEN-DANIEL, L.; ARNON, T. I.; MANASTER, I.; GAZIT, R.; YUTKIN, V.; BENHARROCK, D.; PROGADOR, A.; KESHET, E.; YAGEL, S.; MANDELBOIM, O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. **Nat. Med.**, v. 12, n. 9, p. 149-163, Sep., 2006.

JEBBARI, H.; ROBERTS, C.W.; FERGUSON, D.J.P.; BLUETHMANN, H.; ALEXANDER, J. A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 5, p. 231-239, May., 1998.

JONES, J.L.; LOPEZ, A.; WILSON, M.; SCHULKIN, J.; GIBBS, R. Congenital Toxoplasmosis: A Review. **Obstetrical and Gynecological Survey**, v. 56, n. 5, p. 296-305, Mai., 2001.

JONES, R.L.; STOIKOS, C.; FINDLAY, J.K.; SALAMONSEN, L.A. TGF- β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 217-232, Aug., 2006.

JONES, H.N.; JANSSON, T.; POWELL, T.L. IL-6 stimulates system A amino acid transporter activity in trophoblast cells through STAT3 and increased expression of SNAT2. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 297, n. 5, p. C1228-C1235, Nov., 2009.

JONGERT, E.; LEMIERE, A.; VAN GINDERACHTER, J.; DE CRAEYE, S.; HUYGEN, K.; D'SOUZA, S. Functional characterization of in vivo effector CD4+ and CD8+ T cell responses in acute Toxoplasmosis: an interplay of IFN-gamma and cytolytic T cells. **Vaccine**, v. 28, n. 13, p. 2556-64, Mar., 2010.

JÜTTNER, S.; BERNHAGEN, J.; METZ, C.N.; ROLLINGHOFF, M.; BUCALA, R.; GESSNER, A. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. **J. Immunol.**, v. 161, n. 5, p. 2383-2390, Sep., 1998.

KAMDA, J.D.; NASH, T.E.; SINGER, S.M. *Giardia duodenalis*: Dendritic cell defects in IL-6 deficient mice contribute to susceptibility to intestinal infection. **Exp. Parasitol.**, v. 130, n. 3, p. 288-291, Jan., 2012.

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D.P. et al., **Parasitologia Humana**. Ed.: Atheneu. 11^a ed. São Paulo, p. 147-56, 2005.

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.

KENDALL G, PEEBLES D. Acute fetal hypoxia: the modulating effect of infection. **Early Hum. Dev.**, v. 81, n. 1, p. 27-34, Jan., 2005.

KIM, K.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, n. 3, p. 423-32, Mar., 2004.

KODJIKIAN, L. Toxoplasmosis and pregnancy. **J. Fr. Ophtamol.**, v. 33, n. 5, p. 362-367, May, 2010.

KOGA, K.; ALDO, P.B.; MOR, G. Toll-like receptors and pregnancy: Trophoblast as modulators of the immune response. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, v. 35, n. 2, p. 191-202, April, 2009.

KOPF, M.; BAUMANN, H.; FREER, G.; FREUDENBERG, M.; LAMERS, M.; KISHIMOTO, T.; ZINKERNAGEL, R.; BLUETHMANN, H.; KOHLER, G. Impaired immune and acute-phase responses in Interleukin-6-deficiente mice. **Nature**, v. 368, n. 6469, p. 339-342, Mar., 1994.

KRAVETZ, J.D.; FEDERMAN, D.G. Toxoplasmosis in pregnancy. **Am. J. Med.**, v. 118, n. 3, p. 212-216, Mar., 2005.

LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V.B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 65, n. 12, p. 1900-1915, Jun., 2008.

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

LIU, M.M.; YUAN, Z.G.; PENG, G.H.; ZHOU, D.H.; HE, X.H.; YAN, C.; YIN, C.C.; HE, Y.; LIN, R.Q.; SONG, H.Q.; ZHU, X.Q. *Toxoplasma gondii* microneme protein 8 (MIC8) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis. **Parasitol. Res.**, v. 106, n. 5, p. 1079-1084, Apr., 2010.

LOPES, F.M.R.; GONÇALVES, D.D.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; FREIRE, R.L.; NAVARRO, I.T. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 11, n. 5, p. 496-506, Aug., 2007.

LÜDER, C.G.K.; ALGNER, M.; LANG, C.; BLEICHER, N.; GROSS, U. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, n. 8, p. 833-44, Jul., 2003.

LÜDER, C.G.K.; STANWAY, R.R.; CHAUSSEPIED, M.; LANGSLEY, G.; HEUSSLER, V.T. Intracellular survival of apicomplexan parasites and host cell modification. **Int. J. Parasitol.**, v. 39, n. 2, p. 163-73, Jan., 2009.

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

MEHTA, S.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii* actin depolymerizing factor acts primarily to sequester G-actin. **J Biol Chem.**, v. 285, n. 9, p. 6835-6847, Feb., 2010.

MENENDEZ, C.; ORDI, J.; ISMAIL, M.R.; VENTURA, P.J.; APONTE, J.J.; KAHIGWA, E.; FONT, F.; ALONSO, P.L. The impact of placental malaria on gestational age and birth weight. **J Infect Dis.**, v. 181, n. 5, p. 1740-1745, May., 2000.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação.** Uberlândia: EDUFU, 2005. 273p.

MIYAMOTO, M.; PRAUSE, O.; SJÖSTRAND, M.; LAAN, M.; LÖTVALL, J.; LINDÉN, A. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. **J. Immunol.**, v. 170, n. 9, p. 4665-4672, May., 2003.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, n. 12, p. 1965-1975, Jun., 2004.

MORDUE, D.G.; MONROY, F.; REGINA, M.L.; DINARELLO, C.A.; SIBLEY, L.D. Acute Toxoplasmosis to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines. **J. Immunol.**, v.167, n. 8, p. 4574 ó 4584, Oct., 2001.

MULLA, M. J.; MYRTOLLI, K.; BROSENS, J. J.; CHAMLEY, L. W. ; KWAK-KIM, J. Y. ; PAIDAS, M. J.; ABRAHAMS, V. M. Antiphospholipid antibodies limit trophoblast migration by reducing IL-6 production and STAT3 activity. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 63, n. 5, p. 339-348, May., 2010.

NAGAMATSU, T.; SCHUST, D.J. The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 63, n. 6, p. 460-71, Jun., 2010.

NAGINENI, C.N.; DETRICK, B.; HOOKS, J.J. Transforming growth factor- expression in human retinal pigment epithelial cells is enhanced by *Toxoplasma gondii*: a possible role in the immunopathogenesis of retinochoroiditis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 128, n 2, p. 372-378, May., 2002.

NARUSE, K.; INNES, B. A.; BULMER, J. N.; ROBSON, S. C.; SEARLE, R. F.; LASH, G. E. Secretion of cytokines by villous cytotrophoblast and extravillous trophoblast in the first trimester of human pregnancy. **J. Reprod. Immunol.**, v. 86, n. 2, p. 148-150, Nov., 2010.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana.** 10ª ed. São Paulo: Atheneu, p. 147-156, 2002.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana.** 10ª ed. São Paulo: Atheneu, p. 147-156, 2003.

NORWITZ, E.R.; SCHUST, D.J.; FISHER, S.J. Implantation and the survival of early pregnancy. **N Engl J Med.**, United States, v. 345, n° 19, p. 1400-8, Nov, 2001.

OLIVEIRA, J.G.; SILVA, N.M.; SANTOS, A.A.D.; SOUZA, M.A.; FERREIRA, G.L.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A.V. BeWo trophoblasts are unable to control replication of *Toxoplasma gondii*, even in the presence of exogenous IFN- γ . **Placenta**, v. 27, n. 6-7, p. 691-698, Jun-Jul., 2006.

PASSOS, S.T.; SILVER, J.S.; O'HARA, A.C.; SEHY, D.; STUMHOFER, J.S.; HUNTER, C.A. IL-6 Promotes NK Cell Production of IL-17 during Toxoplasmosis. **J. Immunol.**, v. 184, n. 4, p. 1776-1783, Feb., 2010.

PATTILLO, R.A.; GEY, G.O. The establishment of a cell line of human hormone β synthesizing trophoblastic cells *in vitro*. **Cancer Research.**, v. 28, n. 7, p. 1231-1236, Jul., 1968.

PERLMANN, P.; TROYE-BLOMBERG, M. Malaria and the immune system in humans. **Chem. Immunol.**, v. 80, p. 229-242, 2002.

PFAFF, A.W.; GEORGES, S.; ABOU-BACAR, A.; LETSCHER-BRU, V.; KLEIN, J.P.; MOUSLI, M.; CANDOLFI, E. *Toxoplasma gondii* regulates ICAM-1 mediated monocyte adhesion to trophoblast. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, n. 5, p. 483-489, Oct., 2005b.

PLATTNER, F.; SOLDATI-FRAVE, D. Hijacking of host cellular functions by the Apicomplexa. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 62, p. 471-487, Oct., 2008.

RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. **Semin. Immunol.**, v. 13, n. 4, p. 219-227, Aug., 2001.

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

REY, L. **Parasitologia**, 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Kogan, 2001.

ROBERTSON SA, O'CONNELL A, RAMSEY A. The effect of interleukin-6 deficiency on implantation, fetal development and parturition in mice. **Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.**, v. 31, p. 97-98, 2000.

ROBERTSON, S.A.; GUERIN, L.R.; BROMFIELD, J.J.; BRANSON, K.M.; AHLSTRÖM, A.C.; CARE, A.S. Seminal fluid drives expansion of the CD4 + CD25 + T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. **Biol. Reprod.**, v. 80, n. 5, p. 1036-1045, May, 2009.

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; TONIATTI, C.; PUCCETTI, P.; BISTONI, F.; POLI, V. Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 4, p. 1345-1355, Apr., 1996.

RORMAN, E.; ZAMIR, C.S.; RILKIS, I.; BEM-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis: prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reprod. Toxicol.**, v. 21, n. 4, p. 458-472, May., 2006.

SAKAGUCHI S: Naturally arising Foxp3-expressing CD25 + CD4 + regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 345-352, Apr., 2005.

SCHÄFER-SOMI, S. Cytokine during early pregnancy of mammals: a review. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 75, n. 1-2, p. 73-94, Jan., 2003.

SHAPIRA, S.; HARB, O.S.; MARGARIT, J.; MATRAJT, M.; HAN, J.; HOFFMANN, A.; FREEDMAN, B.; MAY, M.J.; ROOS, D.S.; HUNTER, C.A. Initiation and termination of NF- B signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **J. Cell. Sci.**, v. 118, n. 15, p. 3501-3508, Aug., 2005.

SHEINER, L.; SANTOS, J.M.; KLAGES, N.; PARUSSINI, F.; JEMMELY, N.; FRIEDRICH, N.; WARD, G.E.; SOLDATI-FAVRE, D. *Toxoplasma gondii* transmembrane microneme proteins and their modular design. **Mol. Microbiol.**, v. 9, Jun., 2010. *In Press*.

SIBLEY, L.D. Intracellular Parasite Invasion Strategies. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 248-253, Apr., 2004.

SIBLEY, L.D.; AJIOKA, J.W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 62, p. 329-351, Oct., 2008.

SILVA, M. L.; MARTINS, M. A.; ESPÍRITO-SANTO, L. R.; CAMPI-AZEVEDO, A. C.; SILVEIRA-LEMOES, D.; RIBEIRO, J. G. L.; HOMMA, A.; KROON, E. G.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ELÓI-SANTOS, S. M.; MARTINS-FILHO, O. A. Characterization of

main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. **Vaccine**, v. 29, n. 3, p. 583-592, Jan., 2011.

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

SKARIAH, S.; MCINTYRE, M.K.; MORDUE, D.G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitol. Res.**, v. 107, n. 2, p. 253-260, Jul., 2010.

SPALDING, S.M.; AMENDOEIRA, M.R.R.; CAMILO-COURA, L. Estudo Prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 4, p. 1-14, Jul-Aug., 2003.

STEENSBERG, A.; FISCHER, C.P.; KELLER, C.; MØLLER, K.; PEDERSEN, B.K. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 285, n. 2, p. 433-437, Aug., 2003.

STEPHANOU A, HANDWERGER S. Interleukin-6 stimulates placental lactogen expression by human trophoblast cells. **Endocrinology**, v. 135, n. 2, p. 719-723, Aug., 1994.

SUKHUMAVASI, W.; EGAN, C. E.; WARREN, A. L.; TAYLOR, G. A.; FOX, B. A.; BZIK, D. J.; DENKERS, E. Y. TLR adaptor MyD88 is essential for pathogen control during oral *Toxoplasma gondii* infection but not adaptive immunity induced by a vaccine strain of the parasite. **J. Immunol.**, v. 181, n. 5, p. 3464-3473, Sep., 2008.

SUZUKI, Y.; COLNEY, F. K.; REMINGTON, J. S. Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*. **J. Infect. Dis.**, v. 159, n. 4, p. 790-794, Apr., 1989.

SUZUKI, Y.; RANI, S.; LIESENFELD, O.; KOJIMA, T.; LIM, S.; NQUYEN, T. A.; DALRYMPLE, S.A., MURRAY, R.; REMINGTON, J.S. Impaired resistance to the development of toxoplasmic encephalitis in interleukin 6 deficient mice. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 6, p. 2339-2345, Jun., 1997.

SWEENEY, K.R.; MORRISSETTE, N.S.; LACHAPELLE, S.; BLADER, I.J. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii* is temporally regulated by the host microtubule cytoskeleton. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 11, p. 1680-1689, Apr., 2010.

TENTER, A.M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Brazil, v. 104, n. 2, p. 364-369, Mar., 2009.

TEO, F.C.; ZHOU, X.W.; BOGYO, M.; CARRUTHERS, V.B. Cysteine Protease Inhibitors Block *Toxoplasma gondii* Microneme Secretion and Cell Invasion. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 2, p. 679-688, Feb., 2007.

TILG, H.; DINARELLO, C. A.; MILLER, J. W. IL-6 and APP α : anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. **Immunol. Today**, v. 18, n. 9, p. 428-432, Sep., 1997.

TSUCHIYA S.; YAMABE M.; YAMAGUCHI Y.; KOBAYASHI Y.; KONNO T.; TADA K. Establishment and characterization of a human acute monocyte leukemia cell line. **Int. J. Cancer**, v. 26, n. 2, p. 171-176, Aug., 1980.

UNNO, A.; KITO, K.; TAKASHIMA, Y. Up-regulation of hyaluronan receptors in *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, United States, v. 391, n. 1, p. 477-80, Jan., 2010.

YAROVINSKY, F. Toll-like receptors and their role in the host cell resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunol. Lett.**, Netherlands, v. 119, n. 1-2, p. 17-21, Aug., 2008.

VARGAS-VILLAVICENCIO, J.A.; LÉON-NAVA, M.A.; MORALES-MONTOR, J. Immunoendocrine Mechanisms Associated with Resistance or Susceptibility to Parasitic Diseases during Pregnancy. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 2, p. 114-121, Feb., 2009.

VILLENA, I.; MARLE, M.; DARDE, M.; PINON, J.; AUBERT, D. *Toxoplasma* strain type and human disease: risk of bias during parasite isolation? **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 160-162, Apr., 2004.

WANG, W. J.; HAO, C. F.; LIN, Y.; YIN, G. J.; BAO, S. H.; QIU, L. H.; LIN, Q. D. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua is unexplained recurrent spontaneous abortion patients. **J. Reprod. Immunol.**, v. 84, n. 2, p. 164-170, Mar., 2010.

WILSON, D.C.; GROTEBREG, G.M.; LIU, K.; ZHAO, Y.; FRICKEL, E.M.; GUBBELS, M.J.; PLOEGH, H.L.; YAP, G. S. Differential regulation of effector- and central-memory responses to *Toxoplasma gondii* Infection by IL-12 revealed by tracking of Tgd057-specific CD8⁺ T cells. **PLoS Pathol.**, v. 6, n. 3, p. 1-17, Mar., 2010.

WITOWSKI, J.; KSIAZEK, K.; JÖRRES, A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 61, n. 5, p. 567-579, Mar., 2004.

WONG, S.Y.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmosis in pregnancy. **Clin. Infect. Dis.**, v. 18, n. 6, p. 853-861, Jun., 1994.

ZHOU, X.W.; KAFSACK, B.F.C.; COLE, R.N.; BECKETT, P.; SHEN, R.F.; CARRUTHERS, V.B. The opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii* deploys a diverse legion of invasion and survival proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 40, p. 34233-34244, Oct. 2005.

ANEXO



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. 496/10 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU|
247/10

Projeto Pesquisa: Influência de células trofoblásticas (linhagem BeWo) na modulação da atividade funcional de monócitos em modelo experimental de infecção por toxoplasma gondii.

Pesquisador Responsável: Eloísa Amália Vieira Ferro

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo 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 de entrega do 1º relatório parcial: agosto de 2011.

Data de entrega do relatório final: dezembro de 2011.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO APROVADO.

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

Uberlândia, 30 de julho de 2010

Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora CEP/UFU