

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**A indução da heme oxigenase-1 é capaz de melhorar o resultado adverso da
gestação na toxoplasmose congênita em camundongos**

ANGELO ALVES FERREIRA JÚNIOR

Uberlândia – MG

Agosto – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**A INDUÇÃO DA HEME OXIGENASE-1 É CAPAZ DE MELHORAR O
RESULTADO ADVERSO DA GESTAÇÃO NA TOXOPLASMOSE
CONGÊNITA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito
parcial para obtenção do título de mestre.

Angelo Alves Ferreira Júnior

Orientadora: Profa. Dra. Neide Maria da Silva

Uberlândia-MG

Agosto – 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- F383i
2019 Ferreira Júnior, Angelo Alves, 1991
A indução da heme oxigenase-1 é capaz de melhorar o resultado adverso da gestação na toxoplasmose congênita em camundongos [recurso eletrônico] / Angelo Alves Ferreira Júnior. - 2019.
- Orientadora: Neide Maria da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1367>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.
- I. Imunologia. 2. Toxoplasma gondii. 3. Heme oxigenase-1. 4. Camundongo. I. Silva, Neide Maria da, 1961, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

Dedicado aos meus pais por todo esforço para que esse sonho se concretizasse.

Agradecimentos

Antes de agradecer qualquer coisa/alguém por este trabalho finalizado, tenho que agradecer primeiramente a Deus. Obrigado pela força para que eu não desistisse de nada, obrigado pelas pessoas tão especiais que colocou no meu caminho durante esse tempo ... obrigado!

Obrigado a agência fomentadora desse trabalho CAPES / Fapemig e CNPq e também a Professora Dra. Neide pelo aceite em ser minha orientadora e por todos ensinamentos que aprendi dentro do seu laboratório.

Obrigado aos técnicos que estavam sempre prestativos quando sempre precisei: Ester, Fabrício e Rosiane.

Não tão menos importante aos meus pais (Gina e Angelo) por investirem tanto tempo para que eu me tornasse quem sou hoje. Obrigado por nunca virarem as costas e sempre me apoiarem em tudo aquilo que escolhi, profissionalmente ou no âmbito pessoal. Aos meus irmãos (João Eduardo e Natallia), meus sobrinhos (Marcelo Henrique e Manoela), avós (Lizena e Maria) e toda família.

Não poderia de deixar de agradecer um ser tão especial que me ensinou tanto nesses últimos anos, obrigado Ítalo pela compreensão e cuidado nos dias de aperto quando algo não dava certo, quando a rotina de estudos (desde a graduação) me deixava tão cansado. Obrigado por todo apoio, pelo carinho e por fazer parte de quem sou hoje!

*Um agradecimento especial a todos meus amigos, não sou capaz de citar todos, mas tenho certeza que sempre serão lembrados. Especialmente a Luciana, minha companheira desde a graduação e que se tornou mais que uma amiga, uma irmã. Aos amigos que fiz aqui em Uberlândia: Natália, Lucas, Hugo, Karina, Duda, João Marcos, Daniel, Aryelle e toda a família Monkey, aos amigos que fiz durante o mestrado: Vinícius, Camila, Júlia. **OBRIGADO** pela amizade e apoio de vocês! Vocês são imprescindíveis e sempre serão lembrados onde quer que eu esteja.*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequencias de primers usados para a amplificação dos genes por qPCR	19
--	----

LISTA DE FIGURAS:

- Figura 1. Resultado anormal da gestação em camundongos BALB / c e C57BL / 6 gestantes após infecção por *T. gondii*..... 23
- Figura 2. A infecção por *Toxoplasma gondii* no primeiro terço da gestação leva a alterações histológicas nas placentas e desenvolvimentos embrionários anormais em camundongos C57BL / 6..... 24
- Figura 3. Os camundongos C57BL / 6 e BALB / c apresentaram aspectos quase normais da placenta no 19º dia de gestação e 5 da infecção..... 25
- Figura 4. Expressão do gene HO-1 nos níveis séricos de placenta / útero e bilirrubina de camundongos C57BL / 6 infectados com *T. gondii*..... 26
- Figura 5. A indução de HO-1 melhora o resultado da gravidez em camundongos C57BL / 6 e sua inibição é prejudicial ao resultado da gestação em camundongos BALB / c no dia 8 de gestação e infecção por *T. gondii*..... 28
- Figura 6. A indução ou inibição de HO-1 não altera o parasitismo no pulmão ou placenta / útero no dia 8 de gestação e infecção..... 30

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem

ATPases – adenosinatrifosfatases

CG - Células de glicogênio

CD – Célula dendrítica

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

DNA – Ácido desoxirribonucleico

GAPDH – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

H&E – Hematoxilina e Eosina

HO-1 – Heme Oxigenase 1

IFN- γ – Interferon gamma

LPS – Lipopolissacarídeo

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

PBS – Tampão fosfato salino

qPCR - Reação em cadeia da polimerease quantitativa

T. regs – Células T reguladoras

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	12
1.2 Toxoplasmose (epidemiologia e manifestações clínicas)	13
1.3 Toxoplasmose congênita e imunologia da gestação.....	14
1.4 Heme oxigenase (HO): características e funções.....	15
1.5 HO-1 na interface materno-fetal.....	16
2. Objetivo geral	16
2.1 Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Animais de experimentação.....	17
3.2 Organismos infecciosos.....	17
3.3 Acasalamento e detecção de gestação	17
3.4 Infecção experimental, coleta e processamento do material.....	18
3.7 Imunohistoquímica para detecção de parasitos	21
3.8 Análise estatística.....	21
3.9 Normas de Biossegurança	22
4. RESULTADOS	23
4.1 Camundongos C57BL /6 infectados por <i>T. gondii</i> apresentaram maior taxa de reabsorção no 8º dia de gestação em comparação com camundongos BALB /c.....	23
4.2 A infecção por <i>T. gondii</i> no primeiro terço da gestação leva a alterações histológicas nas placentas, placentação anormal e alterações embrionárias em camundongos C57BL / 6	25
4.3 A infecção por <i>T. gondii</i> aumenta a expressão de HO-1 na placenta / útero, principalmente no primeiro terço da gestação	27
4.4 O bloqueio de HO-1 pelo protoporfirina-zinco (ZnPPIX) prejudicou o resultado da gestação em BALB/c, e a protoporfirina-cobalto (CoPPIX) melhorou o resultado da gestação em camundongos C57BL / 6	30
4.5 A indução ou inibição de HO-1 não alterou o parasitismo na placenta / útero e pulmão de BALB/c ou C57BL/6 no dia 8 de gestação e infecção	32
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS.....	40
8. ANEXOS	47
8.1 Protocolo de dosagem de bilirrubina.....	47
8.2 Certificado de aprovação no Comitê de ética e pesquisa em animais da UFU.....	49

RESUMO

Durante a infecção congênita pelo *Toxoplasma gondii*, a gestação no modelo murino pode ser considerada anormal devido à resposta imune pró-inflamatória na interface materno/fetal e não é condicionada à proliferação do parasita na placenta/útero, sendo assim necessária uma resposta imune regulatória para evitar a reabsorção ou aborto do embrião. A heme oxigenase-1 (HO-1) é uma enzima que catalisa a oxidação da heme para gerar produtos que apresentam efeitos anti-inflamatórios, citoprotetores e antiapoptóticos e está envolvida no sucesso da gestação. O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da indução de HO-1 (tratamento com CoPPIX) ou inibição (tratamento com ZnPPIX) na gestação de duas linhagens de camundongos, uma conhecida por apresentar baixa taxa de reabsorção, BALB/c e outra a apresentar alta taxa de reabsorção, camundongos C57BL/6, sob infecção no início da gestação. Para este propósito, as fêmeas foram infectadas no dia da detecção do tampão vaginal, no início da gestação, e examinadas no dia 8 da infecção, ou infectadas no dia 14 de gestação e examinadas no dia 19 da gestação, onde a expressão do mRNA HO-1 foi testada. Para experimentos adicionais, os animais foram infectados no dia da detecção do tampão vaginal e foram tratados com CoPPIX ou ZnPPIX, sendo assim avaliados no dia 8 da infecção. Observou-se que a expressão de HO-1 é maior no dia 8 de gestação e infecção por *T. gondii* do que no dia 19 de gestação e 5 de infecção. O tratamento com CoPPIX melhorou o resultado da gestação na toxoplasmose congênita em ambas as linhagens de camundongos e as áreas hemorrágicas induzidas pelo tratamento com ZnPPIX na placenta / útero de ambas as linhagens de camundongo infectadas foi prejudicial ao resultado da gestação, mesmo em camundongos BALB / c e não estava associado à carga parasitária. Assim, nossos resultados mostraram que a indução da HO-1 é importante para manter uma gestação com sucesso na toxoplasmose congênita em linhagem de camundongos que apresentam alta taxa de reabsorção.

Palavras-chave: camundongo C57BL/6 ; CoPPIX, heme-oxigenase 1, *Toxoplasma gondii*; ZnPPIX.

ABSTRACT

During congenital *Toxoplasma gondii* infection, gestation in the murine model can be considered responsible for placental / uterine proliferation, thus requiring a regulatory immune response to prevent resorption or abortion of the embryo. The heme oxygenase-1 (HO-1) is an enzyme that catalyzes the oxidation of heme to generate products which present anti-inflammatory, cytoprotective and antiapoptotic effects and, is involved in the success of gestation. The present work aimed to investigate the effect of HO-1 induction (CoPPIX treatment) or inhibition (ZnPPIX treatment) on the gestation of two mouse lines, a statement by the resorption rate, BALB / c and another high presentation. resorption rate, C57BL / 6 mice under early pregnancy infection. To this end, as they were infected on the day of vaginal volume detection, no onset of pregnancy, and examined on day 8 of infection, or infected on day 14 of pregnancy and examined on day 19 of pregnancy, where the expression of HO mRNA -1 was tested. The period of detection of the vaginal diseases were infected with CoPPIX or ZnPPIX, thus being evaluated the 8th day of infection. HO-1 expression was higher on day 8 of pregnancy and *T. gondii* infection than on day 19 of pregnancy and 5 of infection. CoPPIX treatment improved the sense of toxoplasmosis and congenesis as mouse strains and as hemorrhagic areas induced by ZNPPIX treatment in BALB / mice was not absent from the parasitic burden. Thus, the result of the results was an induction of HO-1 to develop congenital toxoplasmosis in a line of mice with a high resorption rate.

Key Words: C57BL/6 mice; CoPPIX, heme-oxygenase-1, *Toxoplasma gondii*; ZnPPIX.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é considerado um protozoário intracelular obrigatório, descoberto por Nicolle e Manceaux em 1908, sendo o agente causador da toxoplasmose (DARD et al., 2016). Pertencente ao filo Apicomplexa, *T. gondii* é responsável por infecções congênitas, podendo levar ao aborto e é uma infecção oportunista em indivíduos imunocomprometidos (UNNO; KITO; TAKASHIMA, 2010).

A incidência das infecções por *T. gondii* são amplamente predominantes em humanos e animais. As duas principais formas de transmissão após o nascimento, é ingestão de alimentos ou água contaminada com oocistos de *T. gondii* eliminados nas fezes de felídeos ou a ingestão de cistos teciduais em carne mal cozida (DUBEY, 1998).

Existem três estágios infecciosos de *T. gondii*: os taquizoítos, presentes no estágio inicial da infecção, os bradizoítos, que são encontrados nos cistos teciduais e são considerados as formas de resistência do parasita e os esporozoítos (em oocistos) (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Ao infectar um hospedeiro intermediário, *T. gondii* diferencia-se em taquizoítos que se disseminam rapidamente nos tecidos do hospedeiro. Embora a maioria dos taquizoítos seja eliminada pelo sistema imunológico, alguns se convertem em bradizoítos, que formam cistos teciduais no cérebro e músculo (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

Os cistos podem persistir durante toda a vida do hospedeiro e são infecciosos se consumidos. A infecção por *T. gondii* é tipicamente assintomática, mas apresenta problemas em indivíduos imunocomprometidos e nos fetos em infecção congênita. Nos seres humanos, a ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos é considerada a principal via de exposição

a *T. gondii*, mas anticorpos foram detectados contra estágios de oocistos, o que sugere a contaminação por oocistos contaminando alimentos e a água, sendo também uma fonte importante de infecção. Os felinos, hospedeiros definitivos excretam entre 2 e 20 milhões de oocistos por dia em suas fezes cerca de 3 a 10 dias após a infecção. À temperatura ambiente e umidade adequada os oocistos esporulam passando por meiose até produzirem oito esporozoítos haploides dentro de 2 esporocistos (PITTMAN; KNOLL, 2015).

1.2 Toxoplasmose (epidemiologia e manifestações clínicas)

Vários surtos de toxoplasmose em seres humanos foram ligados epidemiologicamente ao consumo de água não filtrada. A transmissão durante a amamentação ou a transmissão direta de humano para humano, a não ser da mãe para o feto não foi registrada (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). A contaminação do ambiente e, portanto, dos hospedeiros está ligada a deposição das fezes contendo oocistos por felídeos, gatos domésticos próximos de fazendas ou espécies de felídeos selvagens. A evidência de infecção (principalmente por detecção sorológica e mais raramente por detecção de oocisto ou cisto nos tecidos) foi comprovada para 31 das 39 espécies felíneas do mundo (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Assim, a prevalência nos hospedeiros intermediários depende da presença desses felídeos em seu meio ambiente.

A toxoplasmose acomete um terço da população mundial, com infecções normalmente assintomáticas (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Duas condições proporcionam riscos acrescidos para a doença clínica: 1. Imunossupressão, que normalmente resulta em bradizoítos que se convertem para o estágio de taquizoítos; 2. Uma infecção primária durante a gravidez que pode resultar em infecção congênita do feto, que não possui um sistema imunológico maduro, facilitando assim a replicação do taquizoíto (BLADER et al., 2015).

As manifestações clínicas associadas à infecção por *Toxoplasma* são muito diversas e variam desde miocardite, toxoplasmose ocular (retino-coroidite, coroidite), encefalite e hidrocefalia até doenças mentais (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

1.3 Toxoplasmose congênita e imunologia da gestação

A transmissão materno-fetal de parasitas em humanos ocorre principalmente pela via transplacentária hematogênica (CARLIER et al., 2012). Durante a gestação humana, a transmissão vertical de agentes infecciosos de uma mãe infectada para o feto pode levar a consequências devastadoras ao desenvolvimento do feto. As infecções pré-natais dos fetos são as principais causas de morbidade e mortalidade global (ARORA et al., 2017). A infecção por *T. gondii* no útero pode estar associada à perda da gestação (aborto ou natimorto) ou doença grave no recém-nascido, incluindo cegueira, atraso no desenvolvimento ou manifestações neurológicas como a epilepsia (FAUCHER et al., 2012). A taxa de transmissão vertical é diretamente proporcional ao período em que a gestante adquire a primo-infecção (PINARD; LESLIE; IRVINE, 2003). As estimativas globais da transmissão materno-fetal são aproximadamente 20 a 33% das mães recém-infectadas. Variações importantes também foram observadas de acordo com a idade gestacional no momento da infecção materna, com taxas de transmissão inferiores a 6% quando a infecção é adquirida durante o primeiro trimestre da gestação e aumentando para aproximadamente 22-40% no segundo trimestre e 58-72 % no terceiro trimestre, com as maiores proporções nas últimas semanas antes do nascimento (MONTROYA; REMINGTON, 2008; RABILLOUD; WALLON; PEYRON, 2010).

Em mamíferos a gestação é caracterizada por intensas alterações hormonais, tanto de esteroides sexuais (especialmente o estradiol e progesterona) quanto outros hormônios proteicos (gonadotrofinas, oxitocina e prolactina, dentre outros). Estudos anteriores mostraram que os hormônios não só regulam a gestação, mas também contribuem para a suscetibilidade ou resistência contra algumas doenças parasitárias (KRISHNAN et al., 1996). O sistema imune é capaz de combater muitos agentes patogênicos, mas para uma gestação bem-sucedida, essas células precisam ser controladas para evitar a reação contra os antígenos do feto (PICCINNI, 2003). Essa supressão afeta o sistema imunológico adaptativo, caracterizado pela imunidade mediada por células, e a capacidade de resposta de células T auxiliares (Th) 1 (RAGHUPATHY, 1997; WEGMANN et al., 1993; WEINBERG, 1987). A imunidade celular é, portanto, um componente chave da reação imune do hospedeiro no caso da infecção por *T. gondii* (LINDBERG; FRENKEL, 1977; SCHLÜTER et al., 1991). Os macrófagos, os linfócitos T e as células *Natural Killer (NK)*, por um lado, e as citocinas, por outro, são os principais elementos envolvidos na resposta imune. Os anticorpos desempenham um papel

menor, mas continuam sendo o meio essencial para diagnosticar a toxoplasmose em seres humanos (FILISETTI; CANDOLFI, 2004).

1.4 Heme oxigenase (HO): características e funções

As enzimas HO podem desempenhar uma função metabólica crucial, regulando a biodisponibilidade da heme, o substrato natural da enzima, e a renovação em células e tecidos (MAINES, 1988).

A HO está presente em várias formas de vida, como bactérias, fungos, plantas e mamíferos, protegendo as células de um estresse oxidativo induzido pela heme (CICCARELLI et al., 2007). Sendo ela a enzima encarregada de catalisar o primeiro passo da degradação de Heme em monóxido de carbono (CO), biliverina e ferro (TENHUNEN; MARVER; SCHMID, 1968). Foi observado que a inibição de HO-1 induz a ativação, proliferação e maturação de células T "naive" CD4+ e CD8+, sugerindo um papel importante da enzima no controle da proliferação dessas células (BURT et al., 2010). A realização da oxidação da Heme é feita por duas isoenzimas da heme oxigenase microsomal, HO-1 e HO-2. HO-1 é a heme oxigenase comumente conhecida, cuja atividade pode ser induzida em até 100 vezes em resposta a uma grande variedade de estímulos (metais, heme, hormônios, etc.), sendo que a outra isoenzima, a HO-2, é constitutiva. As duas formas são produtos de dois genes diferentes e diferem em sua expressão tecidual (MAINES, 1988). A HO-1 desempenha um papel fundamental na citoproteção, é anti-oxidante e anti-inflamatória. A maioria das funções fisiológicas de HO-1 estão associadas à sua atividade enzimática no catabolismo da Heme (HEGAZI et al., 2005; NAKAHIRA et al., 2006). Nos seres humanos, a deficiência de HO-1 está associada à susceptibilidade ao estresse oxidativo e ao aumento do estado pró-inflamatório, levando a danos endoteliais graves (YACHIE et al., 1999).

A maioria das doenças inflamatórias estão associadas à produção de radicais livres, levando a algum nível de estresse oxidativo celular e lesão tecidual. Se não for controlado, o estresse oxidativo pode levar as células a sofrer necrose, uma forma de morte celular associada à liberação de seu conteúdo intracelular, incluindo ácido úrico (SHI; EVANS; ROCK, 2003).

1.5 HO-1 na interface materno-fetal

Sabe-se que HO-1 desempenha um papel importante na regulação imune de infecções. HO-1 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, isto é, interleucina (IL) -6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) em células imunes ativadas e, portanto, modula a resposta imune (WIESEL et al., 2000).

A infecção por *Listeria monocytogenes* de células gigantes trofoblásticas de camundongos diminuiu a expressão de heme oxigenase (HO)-1 e da proteína anti-apoptótica "B-cell lymphoma-extra large" (Bcl-XL) e o aumento da expressão inibiu a morte celular induzida pela infecção. In vivo, em camundongos gestantes infectados pela bactéria os níveis de HO-1 e Bcl-XL também foram diminuídos na placenta e o tratamento com um indutor da HO-1 (cobalto protoporfirina) inibiu o aborto infeccioso (TACHIBANA et al., 2011). Fêmeas de camundongos infectados com *Brucella abortus* apresentaram expressão diminuída de HO-1 na placenta, o que correlacionou com aborto infeccioso, e o aumento da expressão de HO-1 por CoPP inibiu o aborto devido a infecção bacteriana (TACHIBANA et al., 2008).

Na gestação, a HO-1 mostrou ser fundamental para resultados bem-sucedidos. A deficiência de HO-1 em camundongos é caracterizada por implantação retardada, placentação patológica e pós-implantação com perda fetal (ZENCLUSSEN et al., 2011). Também foi demonstrado que a administração de HO-1 em camundongos é capaz de melhorar as taxas de aborto ao aumentar a proporção de IL-4 / IFN- γ em linfócitos de baço, bem como a diminuir a apoptose na interface materno-fetal (ZENCLUSSEN et al., 2006).

2. Objetivo geral

- Verificar a influência Heme oxigenase-1 na infecção congênita de camundongos por *T. gondii*.

2.1 Objetivos específicos

- Analisar o índice de aborto/reabsorção fetal em fêmeas de camundongos BALB/c ou C57BL/6 tratadas com o inibidor ou o indutor de HO-1, infectadas com *T. gondii* no primeiro dia de gestação e eutanasiadas no 8º dia de gestação ou infectadas no 13º dia de gestação e eutanasiadas aos 19 dias de gestação;
- Quantificar o parasitismo tecidual no útero/placenta, bem como no pulmão em fêmeas de camundongos BALB/c ou C57BL/6 tratadas com o inibidor ou o indutor de HO-1,

infectadas com *T. gondii* no primeiro dia de gestação e eutanasiadas no 8º dia de infecção ou infectadas no 13º dia gestação e eutanasiadas aos 19 dias de gestação;

- Quantificar as alterações inflamatórias no útero/placenta, em fêmeas de camundongos BALB/c ou C57BL/6 tratadas com o inibidor ou o indutor de HO-1, infectadas com *T. gondii* no primeiro dia de gestação e eutanasiadas no 8º dia de infecção, ou infectadas no 13º dia de gestação e eutanasiadas aos 19 dias de gestação;
- Avaliar a expressão de HO-1 no útero/placenta, em fêmeas de camundongos C57BL/6 tratadas com o inibidor ou o indutor de HO-1, infectadas com *T. gondii* no primeiro dia de gestação e eutanasiadas no 8º dia de infecção, ou infectadas no 13º dia de gestação e eutanasiadas aos 19 dias de gestação;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Foram utilizadas fêmeas de camundongos de 8 - 12 semanas de idade, das linhagens BALB/c e C57BL/6, que foram criados na Rede de Biotérios da UFU (REBIR), livres de patógenos específicos, em ciclos de 12 horas luz/escuro e livre acesso à ração e água filtrada. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em Experimentação animal da UFU, sob o protocolo número 103/17.

3.2 Organismos infecciosos

A cepa ME49 de *T. gondii* foi mantida em camundongos *Swiss*, os quais foram inoculados por via oral com 10 cistos de *T. gondii*. Um mês após o inóculo, foi feito um homogeneizado cerebral em PBS e os cistos foram contados e utilizados para infectar os animais.

3.3 Acasalamento e detecção de gestação

Fêmeas virgens (mínimo de cinco animais para cada grupo experimental) foram acasaladas com machos na proporção de duas fêmeas para cada macho. Todos os dias, pela manhã, as fêmeas foram observadas para verificar a presença da rolha vaginal (mistura de sêmen com secreção vaginal). O dia da detecção desse sinal foi considerado como o primeiro dia de gestação.

As fêmeas com presença da rolha vaginal foram separadas e infectadas com *T. gondii* distinguindo dois grupos experimentais: um grupo de fêmeas foi infectado por via oral no 1º dia de gestação, sendo que um grupo foi eutanasiado aos oito dias de gestação e infecção e o outro infectado aos 14 dias de gestação e avaliados aos dezoito dias de gestação e 5 dias de infecção.

Grupos controle foram avaliados sendo estes compostos por fêmeas não gestantes e não infectadas, bem como gestantes (com 8 e 19 dias de gestação) também não infectadas.

3.4 Infecção experimental, coleta e processamento do material

No primeiro grupo experimental, após o acasalamento e detecção da rolha vaginal, considerado como primeiro dia de gestação, as fêmeas gestantes foram oralmente inoculadas com 5 cistos diluídos em 200 µl de PBS. No dia 5, 6 e 7 de gestação e infecção foi feita a administração intraperitoneal do inibidor ou indutor da atividade de HO-1, no qual foram usados, respectivamente, a protoporfirina de Cobalto IX (CoPPIX) (TACHIBANA et al., 2008) e a protoporfirina de Zinco IX (ZnPPIX). O tratamento com o CoPPIX foi feito a uma concentração de 5mg/kg, e ZnPPIX a uma concentração de 20mg/kg por via intraperitoneal (TULLIUS et al., 2002).

As fêmeas foram anestesiadas com Cetamine (Syntec Brasil Ltda, SP, Brasil)/Xilazine (Schering-Plough Coopers, SP, Brasil) intraperitonealmente (SILVA et al., 2009) e o sangue foi coletado por punção do plexo retro orbital. Após a retração do coágulo, o soro foi segregado por centrifugação do sangue durante 5 minutos a 500 x g e preservado à -80 °C até o momento do uso. As fêmeas foram, então, eutanasiadas por deslocamento cervical e pulmão e tecidos materno/embrionários ou materno/fetais, foram coletados e preservados em diferentes fixadores de acordo com a finalidade experimental.

Quando o útero dos animais gestantes for removido, os mesmos foram documentados quanto aos sítios de implantação. A porcentagem de aborto foi calculada como a razão entre os

sítios de reabsorção (sítios hemorrágicos ou necróticos), pelo total de sítios de implantação (sítios de reabsorção mais sítios de implantação), como previamente descrito (JOACHIM et al., 2001; ZENCLUSSEN et al., 2002; SHIONO et al., 2007).

Os tecidos coletados foram avaliados quanto ao parasitismo tecidual por imunohistoquímica, e alterações histológicas. As lesões histológicas foram analisadas em secções coradas por Hematoxilina e Eosina.

Para microscopia de luz os tecidos foram coletados, fixados em formol tamponado a 10% e posteriormente incluídos em parafina. Foram feitos cortes de 4µm de espessura em micrótomo Leica RM 2125 RTS.

Para a detecção da expressão de HO-1, fragmentos de tecidos materno/embrionários ou materno/fetais foram coletados, lavados em solução salina tamponada com fosfatos (PBS), secos em papel de filtro, acondicionados em tubos *ependorf* e foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, e armazenados à -80°C até o momento do uso.

3.6 Avaliação da expressão de RNA mensageiro para HO-1 nos tecidos materno/embrionários ou materno/fetais dos animais experimentais

A extração do RNA total foi realizada com o reagente Trizol, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Gibco BRL, USA). Brevemente, para cada amostra, foi adicionado o reagente Trizol (1 mL para 100 mg de tecido), agitando por 30 segundos e deixando à temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1 mL da suspensão foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio e a amostra foi centrifugada a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi adicionado o mesmo volume de isopropanol 100%, que sofreu agitação em “vortex” e incubação por 20 minutos a -20°C para precipitar o RNA da fase aquosa. Novamente os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. Feito isso, foi acrescentado 1 mL de etanol 70% e incubado durante toda noite a -20°C. A amostra foi então centrifugada a 12000 x g por 15 minutos a 4°C e o precipitado foi lavado em etanol 100%. As amostras de RNA foram ressuspensas em 50 µl de água deionizada e livre de RNase, sendo, então, as amostras armazenadas a -80° C. Uma alíquota de 5 µl foi utilizada para a obtenção da concentração de RNA/µl nas amostras determinadas usando o aparelho GeneQuant (Pharmacia, USA).

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através de reação de transcrição reversa, com a utilização de transcriptase reversa (Superscript II) e 5µg de RNA, de acordo com as especificações do fabricante. As reações foram realizadas utilizando a enzima Taq polimerase no termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA). Todas as amostras também foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para a GAPDH, utilizado como controle positivo da reação de amplificação. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das seqüências dos primers utilizados. Os resultados foram analisados com base no valor de TC (*threshold cycle*) ou linha de corte, definido após a reação, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atinge um dado limiar, que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Os dados da expressão gênica foram analisados em relação ao gene GAPDH usando o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1. Sequencias de primers usados para a amplificação dos genes por qPCR.

GENE	SEQUÊNCIA
HMOX1	FW 5'GCTGGTGATGGCTTCCTTGT3'
HMOX1	RV 5' GTGGGGCATAGACTGGGTTCT3'
GAPDH	FW 5'-GAGAAACCTGCCAAGTA TGATG-3'
GAPDH	RV 5'-CAGTGTAGCCCAAGATGCCC-3'

FW: forward; RV: reverse

3.7 Imunohistoquímica para detecção de parasitos

O parasitismo tecidual foi avaliado nos tecidos por imunohistoquímica como previamente descrito (SILVA et al., 2010). Resumidamente, os cortes, desparafinizados, foram primeiramente incubados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% para bloquear a peroxidase endógena. O resgate antigênico foi feito em tampão citrato, pH 6.0, em forno microondas e os sítios não específicos foram bloqueados por incubação dos cortes com leite desnatado 3% (Molico – Nestlé). Feito isso, os cortes foram incubados durante a noite toda, com soro de *camundongo* anti-*T. gondii* diluído em saponina 0,01% (1:100) e, posteriormente, com IgG de cabra anti *camundongo* biotinilada (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA). A reação foi amplificada usando o sistema ABC (Kit ABC, PK-4000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Calif.) e desenvolvida com diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA).

Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris, montados entre lâmina e lamínula para serem examinados em microscópio de luz. O parasitismo tecidual foi avaliado contando-se o número de vacúolos parasitóforos e estruturas como cisto presentes em nas seções teciduais. As análises foram feitas utilizando-se uma objetiva de 40x de aumento, em duas secções teciduais por animal e no mínimo utilizando-se cinco animais por grupo experimental.

3.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prisma 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média dos grupos experimentais. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

3.9 Normas de Biossegurança

Todos os procedimentos, incluindo a coleta do material biológico, utilização dos reagentes e dos equipamentos, bem como manuseio e conduta com os animais foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005).

4. RESULTADOS

4.1 Camundongos C57BL /6 infectados por *T. gondii* apresentaram maior taxa de reabsorção no 8º dia de gestação em comparação com camundongos BALB /c

Camundongos C57BL/6 apresentaram maior taxa de reabsorção em comparação com camundongos BALB/c no dia 8 de gestação e infecção (Figura 1A). Camundongos BALB/c apresentaram maior índice de aborto no 19º dia de gestação em comparação com camundongos C57BL/6 (Figura 1B), refletindo assim, maior número de fetos normalmente observados em gestação de camundongos BALB/c em relação aos C57BL / 6. No dia 19 de gestação e 5 de infecção com *T. gondii* ambas as linhagens de camundongos apresentaram índice de aborto semelhante (Figura 1B). Ao ser feita a análise do peso das placentas dessas linhagens, observou-se que a infecção não interferiu nesse parâmetro em camundongos BALB/c ou C57BL/6 que foram infectados no 14º dia de gestação e analisados 5 dias depois (figura 1C). Em relação ao peso dos fetos, os fetos de animais BALB/c apresentaram maior peso em comparação aos fetos de camundongos C57BL/6 (Figura 1D), e a infecção diminuiu o peso dos fetos de camundongos BALB/c, mas não em fetos de camundongos C57BL/6 (Figura 1D).

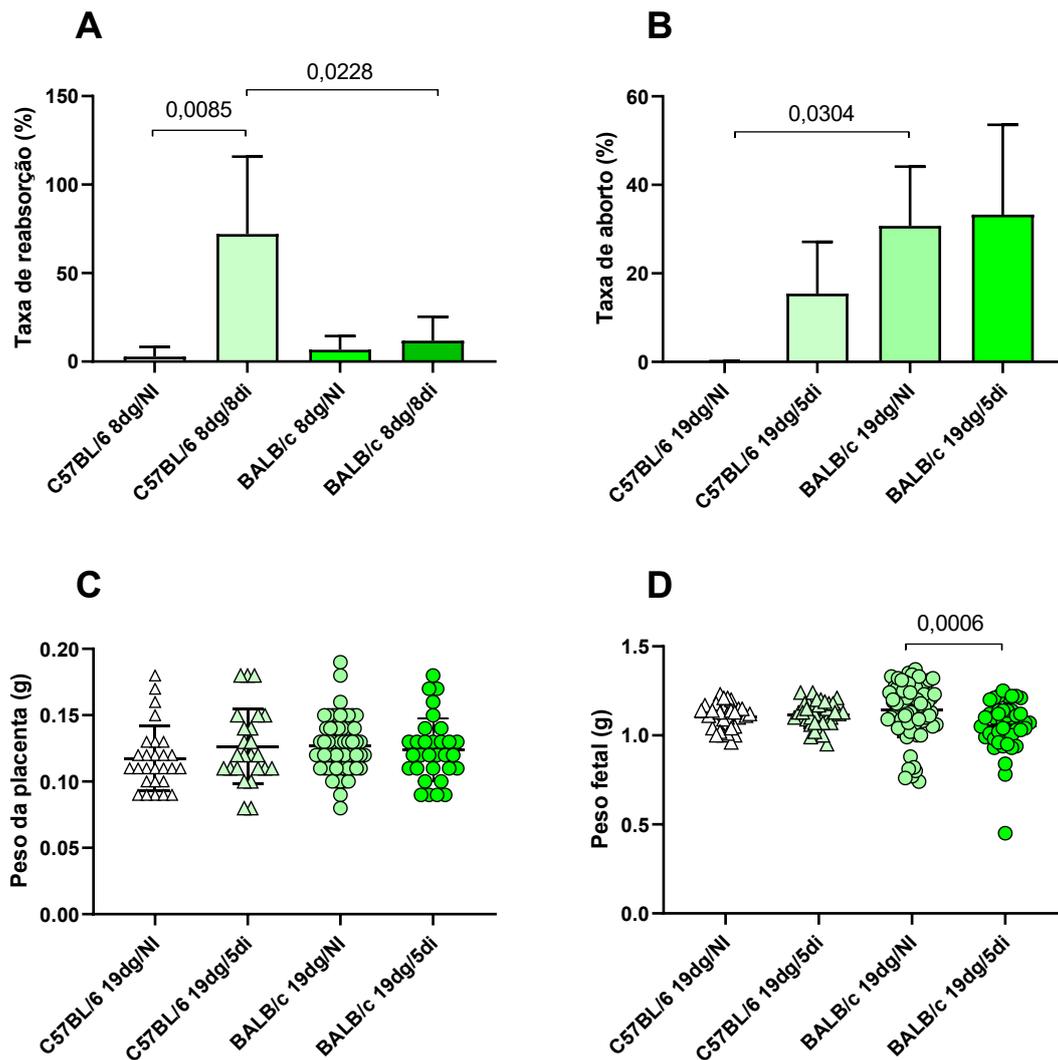


Figura 1. Resultado anormal da gestação em camundongos BALB / c e C57BL / 6 gestantes após infecção por *T. gondii*. Os animais foram acasalados e, no dia da detecção do tampão vaginal ou no 14º dia de gestação, as fêmeas foram infectadas com 5 cistos de *T. gondii*, cepa ME-49, por via oral, e analisadas no 8º dia de gestação e infecção (8dg/8di) ou no dia 19 de gestação e 5 de infecção (19gd5di), respectivamente. A porcentagem de taxas de reabsorção foi calculada como a razão entre os locais de reabsorção e o número total de locais de implantação em gestantes (8dg) e não infectadas (8dg/Ni), em gestantes (8dg) e infectadas (8gd/8di) (A) e em gestantes (19dg) não infectada (19dg/Ni), gestante infectada (19dg/5di) (B). A placenta (C) e o peso fetal (D) de animais infectados no dia 14 de gestação ou não infectados foram examinados no dia 19 de gestação. Os dados representam médias \pm SEM de grupos de cinco camundongos avaliados individualmente. A e B Foi utilizado o teste one-way ANOVA, com teste de múltiplas comparações de Sidak. D. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis test com o teste de múltiplas comparações de Dunn.

4.2 A infecção por *T. gondii* no primeiro terço da gestação leva a alterações histológicas nas placentas, placentação anormal e alterações embrionárias em camundongos C57BL/6

Ao verificarmos as placentas das linhagens de camundongos C57BL/6 e BALB/c, foram observadas áreas hemorrágicas na decídua e, por sua vez, nos sítios de implantação placentária de camundongos C57BL/6 no 8º dia de infecção e gestação (Figura 2A). Em algumas placentas de fêmeas C57BL/6 infectadas foram observados embriões com aspectos degenerativos (Figura 2B) ou placentas necróticas (Figura 2C). Por outro lado, observou-se que o útero e a decídua de camundongos BALB/c infectados tinham uma aparência semelhante à dos camundongos não infectados (Fig. 2D). As placentas de camundongos BALB/c infectados com *T. gondii* no dia 14 de gestação e eutanasiados no dia 19, apresentou vasos mais congestionados em comparação com camundongos não infectados no dia 19 de gestação (Figura 3A, B). Placentas de fêmeas não infectadas C57BL/6 no dia 19 de gestação apresentaram zona juncional mais espessa em comparação com placentas de camundongos BALB/c no mesmo período gestacional (Figura 3D), e a infecção no 14º dia de gestação induziu a congestão dos vasos fêmeas infectadas com BALB/c no mesmo período de observação (Figura 3C).

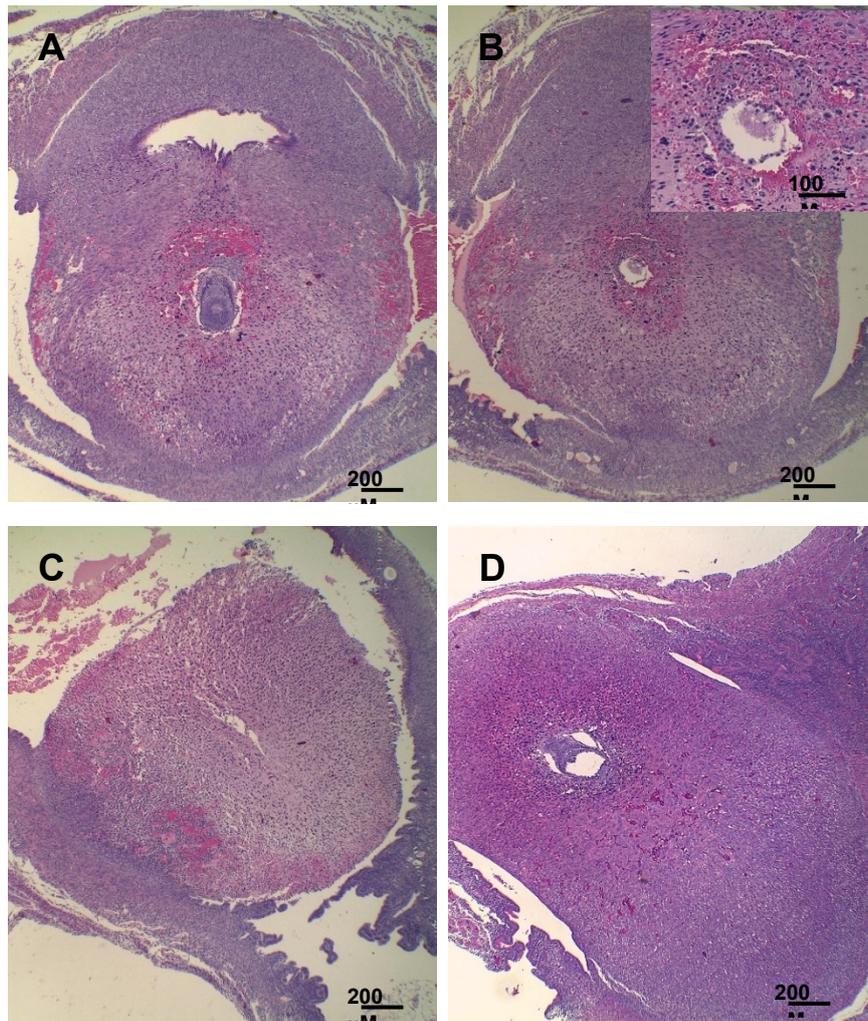


Figura 2. A infecção por *Toxoplasma gondii* no primeiro terço da gestação leva a alterações histológicas nas placentas e desenvolvimentos embrionários anormais em camundongos C57BL/6. Os animais foram acasalados e, no dia da detecção do tampão vaginal, foram infectados com 5 cistos de *T. gondii*, cepa ME-49, por via oral. Cortes de útero/placenta foram corados com H&E e histologicamente examinados. Fotomicrografia de cortes obtidos de C57BL/6 mostrando áreas hemorrágicas no local da decídua e implantação (8dgd) (A), embrião em degeneração (B), placenta necrótica (C) e aspectos normais do útero/placenta de camundongos BALB/c (8dg/8di) (D).

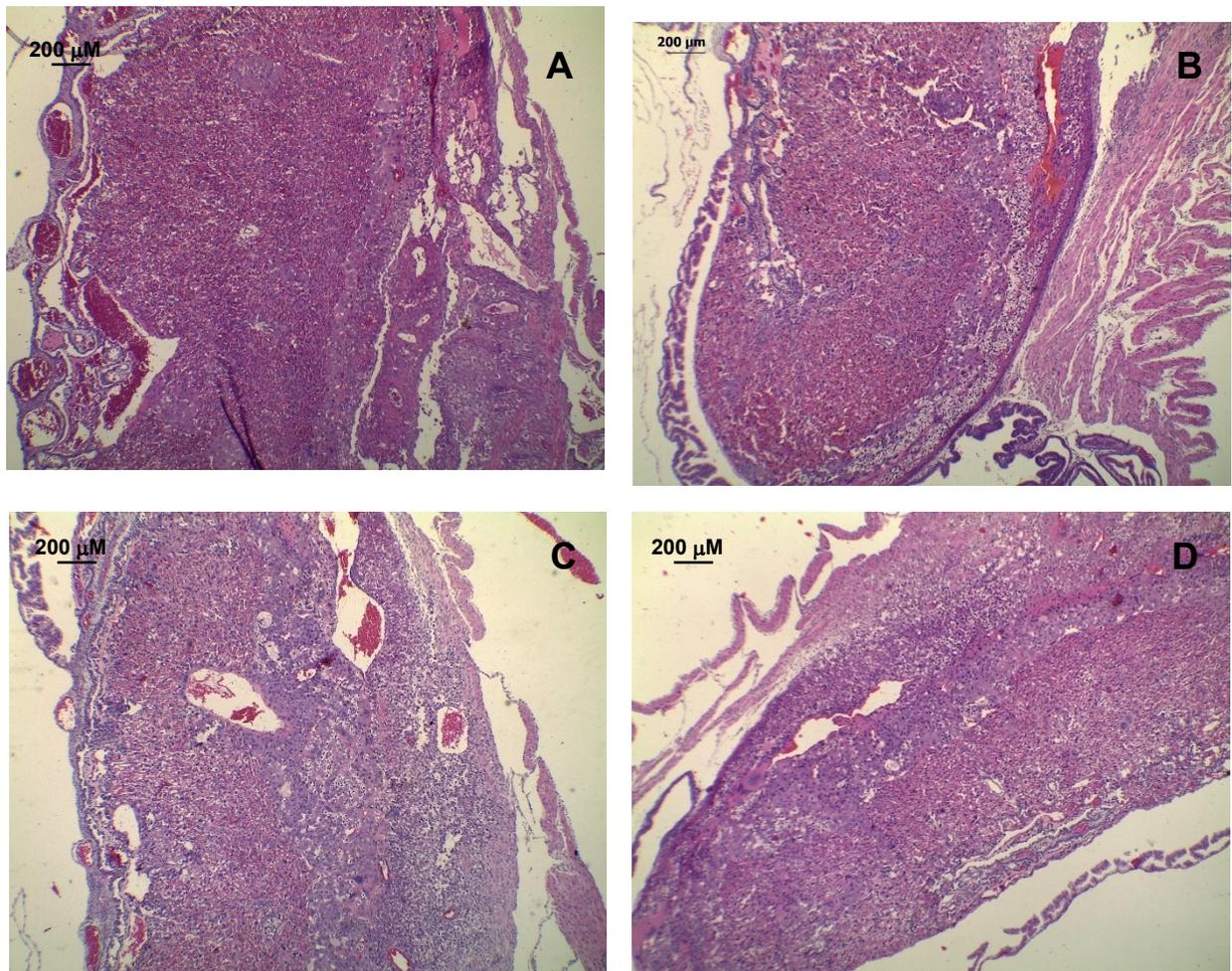


Figura 3. Os camundongos C57BL / 6 e BALB / c apresentaram aspectos quase normais da placenta no 19º dia de gestação e 5 da infecção. Os animais foram acasalados e, no dia 14 de gestação, as fêmeas foram infectadas com 5 cistos de *T. gondii*, da cepa ME-49, por via oral. Cortes de útero / placenta foram corados com H&E e histologicamente examinados. Fotomicrografia de cortes obtidos de camundongos BALB / c mostrando vasos congestionados na placenta (19dg/5di) (A) e placenta normal de camundongos BALB / c não infectados (19dg/Ni) (B). Camundongos C57BL / 6 exibindo vasos congestionados na placenta (19dg/5di) (C) e placenta normal de camundongos não infectados (19dg/Ni) (D). Barra de escala = 200 μm.

4.3 A infecção por *T. gondii* aumenta a expressão de HO-1 na placenta / útero, principalmente no primeiro terço da gestação

A expressão de mRNA de HO-1 foi examinada em fêmeas C57BL/6 infectadas e gestantes. Observou-se que a expressão de mRNA de HO-1 apresentou tendência de aumento no dia 8 e diminuição no dia 19 de gestação em camundongos C57BL/6 (Figura 4A). No entanto, a infecção por *T. gondii* aumentou significativamente a expressão de mRNA de HO-1 no dia 8

de gestação e inoculação do parasita (Figura 4A). De maneira interessante, a expressão de mRNA de HO-1 foi menor na placenta / útero de camundongos C57BL/6 no dia 19 de gestação e 5 de infecção em comparação com o dia 8 de gestação e infecção, apesar de não ser estatisticamente significativa. Além disso, a infecção aumentou aparentemente a expressão de HO-1 no dia 19 de gestação e 5 de infecção em comparação com a expressão de animais não infectados no dia 19 de gestação (Figura 4A).

Em paralelo, a atividade de HO-1 foi examinada mensurando os níveis de bilirrubina em amostras de soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 no dia 8 de infecção e gestação. Verificou-se que as amostras de soro dos camundongos C57BL/6 no dia 8 de infecção e gestação apresentaram os níveis de bilirrubina similares aos de camundongos não infectados e não gestantes (Fig. 4C). Em camundongos BALB/c verificou-se que os níveis de bilirrubina aumentaram com a infecção, apesar de forma não estatisticamente significativa (Figura 4B).

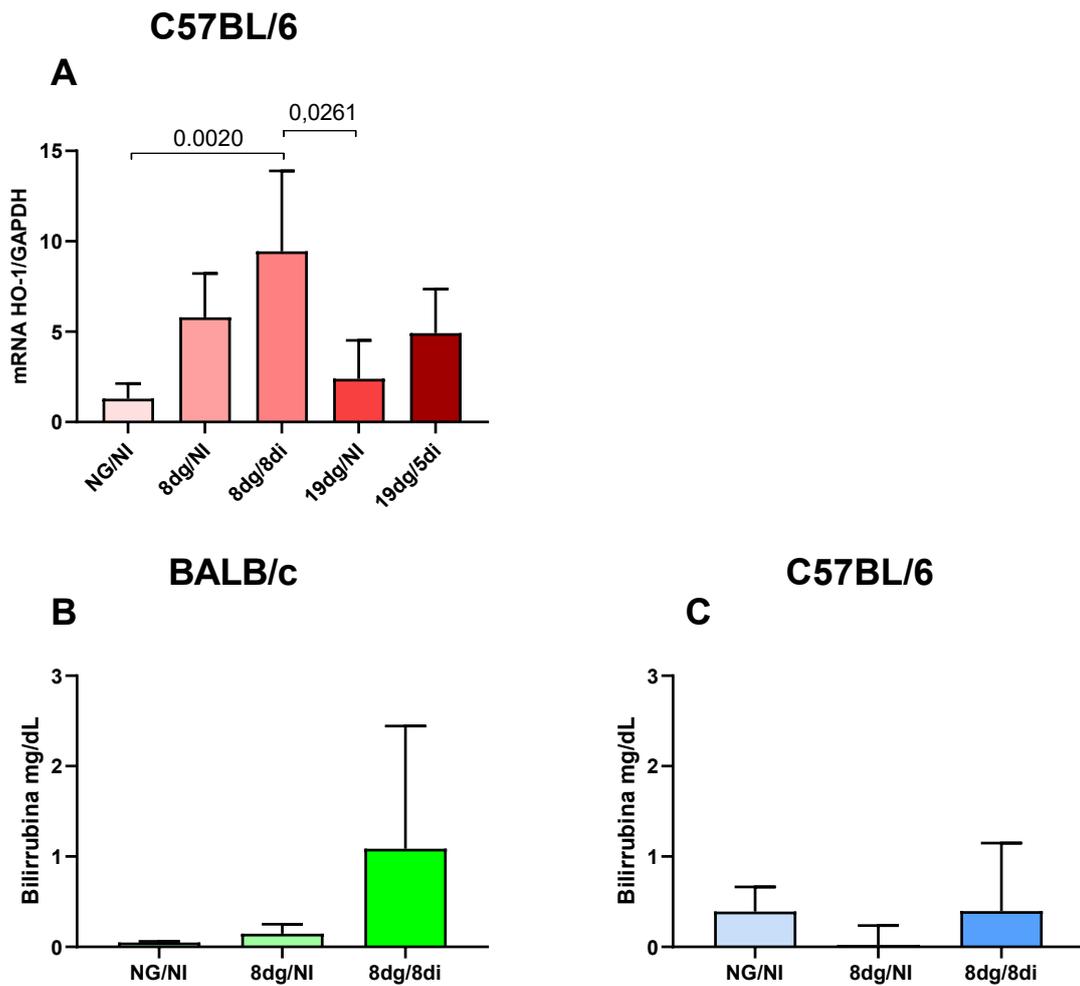


Figura 4. Expressão do gene HO-1 nos níveis séricos de placenta / útero e bilirrubina de camundongos C57BL / 6 infectados com *T. gondii*. Os animais foram acasalados e, no dia da detecção do tampão vaginal ou no 14º dia de gestação, as fêmeas foram infectadas com 5 cistos de *T. gondii*, cepa ME-49, por via oral, e analisadas no 8º dia de gestação e infecção (8dg/8di) ou no dia 19 de gestação e 5 de infecção (19gd5di), respectivamente. Os níveis relativos da expressão do gene HO-1 foram calculados por referência ao gene GAPDH em cada amostra, utilizando o modo do ciclo limiar (Ct) (A). Os níveis de bilirrubina foram medidos em soros de camundongos infectados com camundongos BALB/c (B) e C57BL/6 (C) por um kit analítico como um indicativo da atividade de HO-1. Os dados são representativos de um experimento. A, Foi utilizado o teste one-way ANOVA, com teste de múltiplas comparações de Sidak. Dados representam médias ± SEM.

4.4 O bloqueio de HO-1 pelo protoporfirina-zinco (ZnPPIX) prejudicou o resultado da gestação em BALB/c, e a protoporfirina-cobalto (CoPPIX) melhorou o resultado da gestação em camundongos C57BL / 6

Como foi observado, os camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados nos 14 dias de gestação e observados 5 dias depois apresentaram taxa de reabsorção semelhante à dos camundongos gestantes não infectados; e a expressão de HO-1 é induzida pela infecção por *T. gondii* mais expressivamente no dia 8 de gestação e inoculação do parasita, decidimos examinar o efeito da indução ou inibição da enzima HO-1 somente no 8º dia de gestação e infecção. As fêmeas C57BL/6 infectadas com *T. gondii* no dia da detecção do rolha vaginal e tratadas com ZnPP apresentaram taxa de reabsorção semelhante aos animais não tratados e infectados da mesma linhagem (Figura 5A). De maneira interessante, quando os camundongos C57BL/6 foram infectados e tratados com CoPP, eles apresentaram taxa de reabsorção diminuída (Figura 5A). Camundongos BALB/c infectados e tratados com CoPP apresentaram menor taxa de reabsorção (cerca de 4,7%) (Figura 5A) em comparação com animais não tratados (cerca de 11,8%) (Figura 1A), porém quando estes animais foram infectados e posteriormente tratados com ZnPP apresentaram um aumento na taxa de reabsorção (cerca de 23,75%) (Figura 5A).

Apesar de camundongos BALB/c infectados com *T. gondii* e tratados com CoPP apresentarem placentas com características normais, alguns animais apresentaram hemorragias na placenta (Figura 5B e 5C). No entanto, a maioria dos animais tratados com ZnPP e infectados apresentaram grandes áreas hemorrágicas na placenta, com embriões de aspectos desorganizados (Figura 5D).

Quase todas as placentas e embriões de camundongos C57BL/6 tratados com CoPP observados no 8º dia de gestação e infecção apresentaram aspectos normais (Figura 5E e 5F). No entanto, a maioria das placentas de camundongos C57BL/6 infectados e tratados com ZnPP apresentou-se hemorrágica e / ou necrótica (Figura 5G).

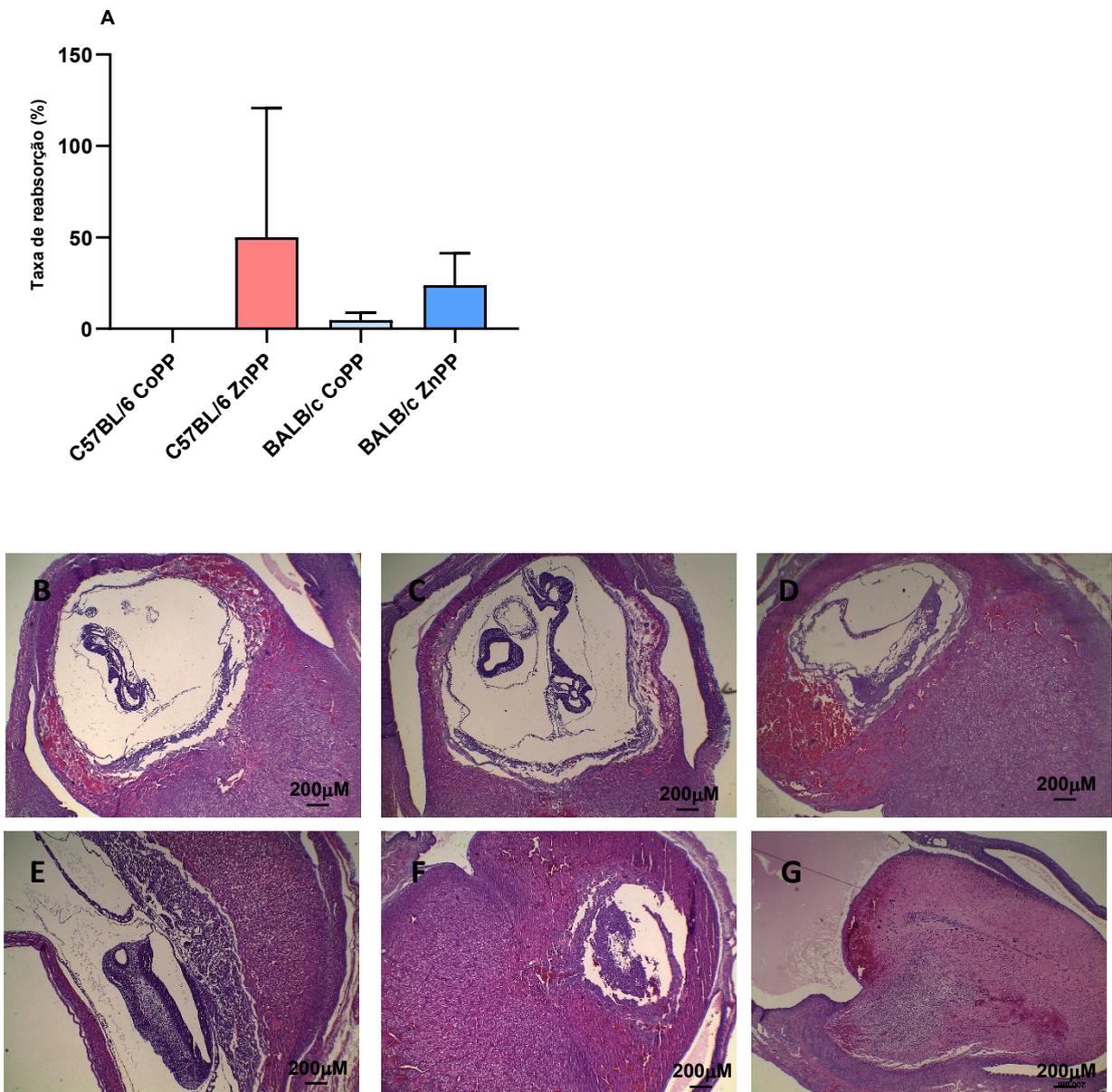


Figura 5. A indução de HO-1 melhora o resultado da gravidez em camundongos C57BL / 6 e sua inibição é prejudicial ao resultado da gestação em camundongos BALB / c no dia 8 de gestação e infecção por *T. gondii*. Camundongos C57BL / 6 e BALB / c foram acasalados e, no dia da detecção do tampão vaginal, foram infectados com 5 cistos de *T. gondii*, cepa ME-49, por via oral; foram tratados com ZnPPIX (20mg / kg / dia) ou CoPPIXIX (5mg / kg / dia) por via subcutânea nos dias 5, 6 e 7 de gestação e foram eutanasiados no dia 8 de gestação (8dg/8di). A porcentagem de taxas de reabsorção foi calculada como a razão entre os locais de reabsorção e o número total de locais de implantação (A). Fotomicrografia de cortes obtidos de camundongos BALB / c infectados e tratados com CoPPIXIX mostrando áreas hemorrágicas na placenta (8dg8di) (B e C), maiores em camundongos BALB / c tratados com ZnPPIX (8dg8di) (D). Fotomicrografia de cortes obtidos de camundongos tratados com

C57BL / 6 CoPPIXIX com aspectos normais (8dg8di) (E e F) e camundongos tratados com C57BL / 6 ZnPPIX mostrando placenta com hemorragia e aspectos necróticos (8dg8dpi) (G). Barra de escala = 200 μ m.

4.5 A indução ou inibição de HO-1 não alterou o parasitismo na placenta / útero e pulmão de BALB/c ou C57BL/6 no dia 8 de gestação e infecção

Camundongos C57BL/6 apresentaram uma tendência a ter mais parasitas no tecido pulmonar em comparação com camundongos BALB/c no dia 8 de gestação e infecção (Figura 6A) e o tratamento com CoPPIX ou ZnPPIX não interferiu na carga parasitária no órgão na mesma condição experimental (Figura 6 B).

Em relação às amostras de tecido placentário / uterino, o parasita raramente foi encontrado nesses tecidos aos 8 dias de gestação e infecção em animais de ambas as linhagens tratados ou não com CoPPIX ou ZnPPIX (Figura 6C e 6D).

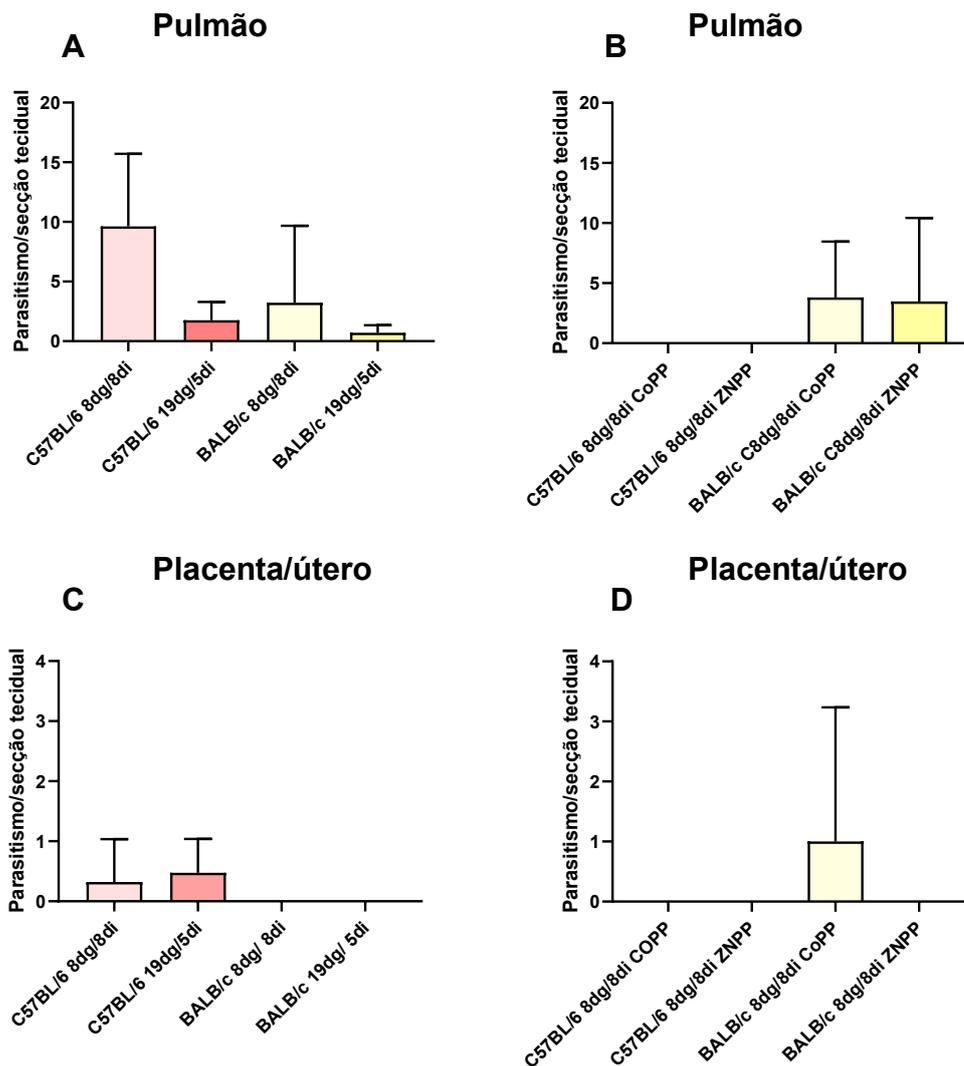


Figura 6. A indução ou inibição de HO-1 não altera o parasitismo no pulmão ou placenta / útero no dia 8 de gestação e infecção. Os animais foram acasalados e, no dia da detecção do tampão vaginal ou no 14º dia de gestação, as fêmeas foram infectadas com 5 cistos de *T. gondii*, linhagem ME-49, por via oral, e analisadas no 8º dia de gestação e infecção (8dg/8di) ou no dia 19 de gestação e 5 de infecção (19dg/5di), respectivamente. Em um novo conjunto de experimentos, camundongos C57BL / 6 e BALB / c foram acasalados e, no dia da detecção do tampão vaginal, foram infectados com 5 cistos de *T. gondii*, cepa ME-49, por via oral; foram tratados com ZnPPIX (20mg / kg / dia) ou CoPPIX (5mg / kg / dia) por via subcutânea nos dias 5, 6 e 7 de gestação e foram eutanasiados no dia 8 de gestação (8dg/8di). O parasitismo tecidual foi avaliado por ensaio imunoistoquímico no pulmão (A e B) e na placenta / útero (C e D).

5. DISCUSSÃO

Neste estudo e outros encontrados na literatura é mostrado que o resultado adverso durante a gestação e infecção por *T. gondii* no modelo de camundongo é provocado principalmente pela resposta imune pró-inflamatória na interface fetal materna e não pela proliferação do parasita in situ (COUTINHO et al, 2012). Segundo (COUTINHO et al, 2012), camundongos BALB/c e C57BL/6 apresentaram carga parasitária semelhante e baixa na placenta / útero no 8º dia de gestação e infecção. No presente trabalho, novamente mostramos que camundongos BALB/c e C57BL/6 apresentaram carga parasitária semelhante e baixa na placenta / útero no 8º dia de gestação e infecção. *T. gondii* foi detectado em apenas uma placenta de 6, mas não no útero, de uma fêmea BALB/c infectada com a cepa M7741 no dia 12-15 da gestação, e em nenhuma placenta ou útero de animais infectados com cepa ME-49 (PEZERICO et al., 2009). Camundongos Swiss-Webster e 129sv apresentaram baixa carga parasitária no útero quando infectados com 10 cistos ME-49 por via oral no 10º dia de infecção e gestação (SENEGAS et al., 2009). Pelo menos em camundongos, o aborto causado por *T. gondii* no início da gestação deve-se a uma liberação maciça de IFN- γ , e não por um efeito direto do parasita na interface fetal materna (SENEGAS et al., 2009). Além disso, camundongos C57BL/6 infectados com a cepa RH no 8º dia de gestação e examinados 6 dias depois apresentaram aumento dos níveis de IFN- γ na interface materno-fetal e a razão de IL-10 / IFN- γ e TGF-b / IFN- γ foram diminuídos, em paralelo com números absolutos diminuídos de Tregs CTLA-4 + e Tregs PD-1 + (LIU et al., 2014).

Animais das duas linhagens também apresentaram baixa carga parasitária na placenta / útero no 5º dia de infecção e 19 de gestação. De acordo com trabalhos anteriores, que mostraram que camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com 20 cistos de Fukaya *T. gondii* por via oral na segunda semana de gestação apresentaram baixa carga parasitária detectada por PCR na placenta no dia 18 de gestação (HE et al., 1997). Além disso, os animais de ambas as linhagens infectadas no dia 14 da gestação e examinados no dia 5 da infecção (segunda semana)

apresentaram resultados de gestação semelhantes aos dos camundongos não infectados, apesar dos vasos congestionados observados na placenta. De forma interessante, a infecção no segundo terço da gestação diminuiu o peso dos fetos de BALB/c, mas não de camundongos C57BL / 6. Em camundongos, a zona de juncional está entre o labirinto e a superfície materna, e entre a zona juncional e superfície materna está uma zona descontínua de células gigantes trofoblásticas (GEORGIADIS; FERGUSON-SMITH; BURTON, 2002) e a partir do dia embrionário 12.5, células de glicogênio (CG) na camada juncional migra para decídua [(REDLINE et al., 1993); (BOUILLOT et al., 2006); (ADAMSON et al., 2002)]. No dia 17.5 da gestação, a maioria das ilhotas de CG na decídua entra em uma fase lítica e forma grandes lacunas que são preenchidas com glicogênio, que poderia fornecer uma fonte substancial de energia no final da gestação ou durante o parto (ADAMSON et al., 2002). Alterações no número de células de glicogênio na placenta, se estas aumentam ou diminuem, têm sido relacionadas com alterações no peso fetal (AKISON et al., 2017). Estes dados sugerem que a zona juncional mais espessa pode estar contribuindo de alguma forma para o melhor desenvolvimento de fetos de fêmeas C57BL/6 sob infecção por *T. gondii* no final da gestação. Experimentos adicionais são necessários para esclarecer este ponto.

Com relação ao desfecho da gestação, verificou-se que camundongos C57BL/6 apresentaram pior resultado gestacional no 8º dia de gestação e infecção com a cepa ME-49 (5 cistos), indicada pela alta taxa de reabsorção e alterações histológicas na placenta / útero comparadas com os camundongos BALB/c. Foi anteriormente demonstrado que as fêmeas de C57BL/6 apresentam níveis mais altos de TNF sistemicamente no dia 8 de gestação e infecção com a cepa ME-49 do que os camundongos BALB/c (COUTINHO et al, 2012). Assim, nos interessamos em conhecer o efeito da HO-1, cujos produtos de sua atividade apresentam efeito anti-inflamatório, citoprotetor e antiapoptótico (OTTERBEIN et al., 2003). Para este propósito, a HO-1 foi induzida (tratamento com CoPPIX) ou inibida (tratamento com ZnPPiX) em camundongos gestantes e infectados com *T. gondii*, onde foram observados que nos camundongos C57BL/6 havia uma alta taxa de reabsorção e nos BALB/c uma baixa taxa de reabsorção, nas quais o resultado gestacional foi examinado.

Inicialmente, analisou-se a expressão do mRNA de HO-1 na placenta / útero de camundongos C57BL/6 não infectados e aos 8 dia de gestação e infecção, onde observou-se que a expressão do mRNA de HO-1 aumentou no terço inicial-médio de gestação (8 dias) e diminuiu no terço final da gestação (19 dias de gestação). Estes resultados estão de acordo com outros que mostraram que os camundongos C57BL/6 apresentaram pico de expressão de

mRNA de HO-1 placentária, no dia 15.5 e diminuíram posteriormente sendo menores no dia 18.5 (ZHAO et al., 2009). De maneira interessante, a infecção por *T. gondii* aumentou a expressão de mRNA de HO-1 na placenta / útero de camundongos C57BL/6 principalmente no 8º dia de gestação e infecção quando se observam os maiores efeitos da infecção in situ, sugerindo um efeito compensatório do mecanismo da HO-1 na tentativa de combater a intensa inflamação induzida pela infecção por *T. gondii*. Pelo contrário, os camundongos ICR infectados com *Brucella abortus* no dia 4.5 e examinados no dia 18.5 da gestação mostraram uma diminuição na expressão da proteína HO-1 na placenta (TACHIBANA et al., 2008). Além disso, a infecção por *Listeria monocytogenes* em células gigantes trofoblásticas de camundongo *in vitro* diminuiu os níveis de expressão de HO-1 e Bcl-XL, uma proteína antiapoptótica. Os camundongos BALB/c infectados com *L. monocytogenes* no dia 13.5 e examinados no dia 16.5 da gestação apresentaram uma diminuição nas expressões da proteína HO-1 e Bcl-XL na placenta (TACHIBANA et al., 2011).

No presente estudo, quando a HO-1 foi induzida por CoPP em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados, observou-se uma melhora no resultado da gestação, que foi mais evidente em camundongos C57BL / 6. Além disso, a placenta e os fetos apresentaram aspectos quase normais. Esse efeito pode estar relacionado ao anti-inflamatório da atividade da HO-1, que poderia contrabalançar o efeito pró-inflamatório da infecção por *T. gondii*, que é prejudicial para o resultado da gestação (COUTINHO et al, 2012). Camundongos ICR tratados com CoPPIX no 4,5 dia da gestação e infectados com *B. abortus* apresentaram um aumento na expressão de HO-1 na placenta no dia 18,5 da gestação que foi associada com alta taxa de nascimento de camundongos (TACHIBANA et al., 2008) e tratamento de camundongos BALB/c com CoPP no dia da infecção (13,5 gestação) melhoraram a taxa de nascimentos em infecção por *L. monocytogenes* que foram associados com os níveis de expressão de HO-1 e Bcl-XL restaurados (AUBOUY et al., 2015).

Em relação a um parasita *Plasmodium*, pertencente ao filo Apicomplexa, a expressão de CD36 e HO-1 por células imunes inatas (monócitos obtidos de células mononucleares do sangue periférico) de mulheres com malária associada à gestação foi correlacionada com menor parasitemia e aumento do peso ao nascer do bebê (SCHUMACHER et al., 2012).

Em relação ao mecanismo envolvido no melhor prognóstico da gestação na infecção congênita por *T. gondii* em camundongos sob indução com HO-1, isso pode estar relacionado ao mecanismo anti-inflamatório da HO-1 e ao efeito direto das células T reguladoras. Foi previamente demonstrado que a exposição de células dendríticas (CDs) derivadas de medula

óssea de doadoras gestantes normais a CDs induzidas por LPS para secretar citocinas IL-10 e TGF- β e a adição de CoPPIX à cultura DC, levou a um aumento na os níveis de IL-10 e TGF- β secretados [37]. O efeito protetor das células T reguladoras no desfecho da gestação murina é mediado pela HO-1 e, o bloqueio de HO-1 induz as células dendríticas (CDs) a um estado maduro que por sua vez promove a ação das células T efetoras (AUBOUY et al., 2015). Além disso, o bloqueio de HO-1 em células Treg que foram transferidas para uma combinação de modelo murino propensa a aborto CBA / J6DBA / 2J anula o efeito protetor de Treg e provoca aborto (SCHUMACHER et al., 2012). De acordo, a superexpressão de HO-1 pela transferência de genes adenovirais no modelo de camundongos propicia a combinação de aborto com CBA / J \times DBA / 2J melhora o prognóstico da gestação nesses animais (ZENCLUSSEN et al., 2011).

Em relação ao papel das células T reguladoras na toxoplasmose congênita, foi mostrado anteriormente que a infecção com a cepa RH de *T. gondii* diminuiu as células T CD4 + CD25 + Foxp3 + reguladoras (Treg) no baço e as células Foxp3 + na interface materno-fetal de camundongos C57BL/6 gestantes e infectados no dia 14 de gestação e 6 de infecção (Y. et al., 2008) e, células CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ na placenta de animais infectados da mesma linhagem de camundongos infectados de forma semelhante em paralelo com um decréscimo de TGF- β e um aumento de células CD4⁺ IL-17⁺ na placenta (ZHANG et al., 2012). Os camundongos C57BL/6 infectados com 400 taquizoítos da cepa RH no dia 7 de gestação mostraram níveis aumentados de moléculas relacionadas à apoptose Caspase-3 e Caspase-8 clivadas em células Tregs decíduais no dia 7 da inoculação do parasita em paralelo com desfecho desfavorável da gestação, e o tratamento com IL-10 melhora o resultado da gestação. Por outro lado, camundongos IL-10 - / - mostraram uma regulação positiva dessas moléculas e apresentaram um pior resultado na gestação (LAO et al., 2015). Além disso, não apenas a infecção com o parasita afeta as células T regs na placenta / útero na gestação, os antígenos excretados secretados (ESA) de *T. gondii* induzem aborto em camundongos C57BL/6 no início (G5) e terço intermediário (G10), o que foi associado com diminuição da frequência e função supressora das células reguladoras CD4 + CD25 + no sangue periférico, linfonodo inguinal e baço, associado com níveis elevados de IFN- γ sistemicamente (CHEN et al., 2013). É importante ressaltar que o tratamento in vitro com IFN- γ das células gigantes trofoblásticas (TG) derivadas da linhagem de células-tronco trofoblásticas de camundongos diminuiu a expressão da proteína HO-1, uma citocina que aumenta na placenta / útero de camundongos BALB / c e C57BL/6 no dia 8 de gestação e infecção (manuscrito em preparação).

Por outro lado, o tratamento com ZnPP foi capaz de piorar o resultado da gestação em camundongos BALB/c, uma linhagem de camundongos que normalmente apresentam melhor resultado na gestação em comparação com camundongos C57BL/6 em infecção por *T. gondii*. As fêmeas BALB/c e C57BL/6 infectadas com *T. gondii* e tratadas com ZnPP apresentaram áreas hemorrágicas na placenta / útero e a linhagem C57BL/6 também apresentou placentas necróticas no 8º dia de gestação e infecção. De acordo com a nossa observação, foi anteriormente demonstrado que placentas Hmox1 +/- e Hmox1 - / - apresentaram áreas de fibrose e hemorragia (ZENCLUSSEN et al., 2011), e o tratamento com ZnPP a uma concentração de 40 mg / kg nos dias 0, 3 e 6 de gestação aumentou a taxa média de aborto de 0% para 33,3% em mulheres no dia 14 de gestação (SCHUMACHER et al., 2012).

6. CONCLUSÃO

Assim, concluímos que nosso estudo indica um melhor resultado da gestação observado com o tratamento CoPPIX em camundongos gestantes infectados com *T. gondii*, sendo observado na presente investigação, que este fato poderia estar relacionado à indução de HO-1 e, provavelmente, associado com infiltração e função das células Tregs na interface materna fetal. Essa hipótese precisa ser esclarecida com experimentos adicionais.

7. REFERÊNCIAS

ADAMSON, S. L. et al. Interactions between Trophoblast Cells and the Maternal and Fetal Circulation in the Mouse Placenta. *Developmental Biology*, v. 250, n. 2, p. 358-373, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)90773-6](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)90773-6)

AKISON, L. et al. Review: Alterations in placental glycogen deposition in complicated pregnancies: Current preclinical and clinical evidence. *Placenta*, v. 54, p. 52-58, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.01.114>

AUBOUY, A. et al. Nrf2-driven CD36 and HO-1 gene expression in circulating monocytes correlates with favourable clinical outcome in pregnancy-associated malaria. *Malaria Journal*, v. 14, n. 1, p. 358, 2015.

<https://doi.org/10.1186/s12936-015-0888-8>

ARORA, N. et al. Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy. *Cell host & microbe*, v. 21, n. 5, p. 561-567, 3 maio 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.007>

BLADER, I. J. et al. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. *Annual review of microbiology*, v. 69, p. 463-85, 4 jan. 2015.

<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>

BOUILLOT et al. Tracing the Glycogen Cells with Protocadherin 12 During Mouse Placenta Development. *Placenta*, v. 27, n. 8, p. 882-888, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.09.009>

BURT, T. D. et al. Naive human T cells are activated and proliferate in response to the heme oxygenase-1 inhibitor tin mesoporphyrin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 185, n. 9, p. 5279-88, 1 nov. 2010.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903127>

CARLIER, Y. et al. Congenital parasitic infections: a review. *Acta tropica*, v. 121, n. 2, p. 55-70, 3 fev. 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.018>

CHEN, J. et al. The Dysfunction of CD4+CD25+ Regulatory T Cells Contributes to the Abortion of Mice Caused by *Toxoplasma gondii* Excreted-Secreted Antigens in Early Pregnancy. *PLoS ONE*, v. 8, n. 7, p. e69012, 2013.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069012>

CICCARELLI, A. et al. Effect of haemin on growth, protein content and the antioxidant defence system in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, v. 134, n. Pt 7, p. 959-65, jul. 2007.

<https://doi.org/10.1017/S0031182007002399>

DARD, C. et al. Relevance of and New Developments in Serology for Toxoplasmosis. *Trends in parasitology*, v. 32, n. 6, p. 492-506, 3 jun. 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.001>

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*, v. 28, n. 7, p. 1019-24, 3 jul. 1998.

[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00023-X)

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical microbiology reviews*, v. 11, n. 2, p. 267-99, 3 abr. 1998.

<https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.267>

FAUCHER, B. et al. Long-term ocular outcome in congenital toxoplasmosis: a prospective cohort of treated children. *The Journal of infection*, v. 64, n. 1, p. 104-9, jan. 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2011.10.008>

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, v. 40, n. 1, p. 71-80, 4 jan. 2004.

GEORGIADES; FERGUSON-SMITH, A. C.; BURTON, G. J. Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae. *Placenta*, v. 23, n. 1, p. 3-19, 2002.

<https://doi.org/10.1053/plac.2001.0738>

HEGAZI, R. A. et al. Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway. *The Journal of experimental medicine*, v. 202, n. 12, p. 1703-13, 1 dez. 2005.

<https://doi.org/10.1084/jem.20051047>

KRISHNAN, L. et al. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 156, n. 2, p. 644-52, 1 jan. 1996.

LAO, K. et al. IL-10 regulate decidual Tregs apoptosis contributing to the abnormal pregnancy with *Toxoplasma gondii* infection. *Microbial Pathogenesis*, v. 89, p. 210-216, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.002>

LIU, Y. et al. Adoptive Transfer of Treg Cells Counters Adverse Effects of *Toxoplasma gondii* Infection on Pregnancy. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 210, n. 9, p. 1435-1443, 2014.

<https://doi.org/10.1093/infdis/jiu265>

MAINES, M. D. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 2, n. 10, p. 2557-68, 5 jul. 1988.

<https://doi.org/10.1096/fasebj.2.10.3290025>

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *Lancet (London, England)*, v. 363, n. 9425, p. 1965-76, 6 jun. 2004.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 47, n. 4, p. 554-66, 5 ago. 2008.

<https://doi.org/10.1086/590149>

NAKAHIRA, K. et al. Carbon monoxide differentially inhibits TLR signaling pathways by regulating ROS-induced trafficking of TLRs to lipid rafts. *The Journal of experimental medicine*, v. 203, n. 10, p. 2377-89, 1 out. 2006.

<https://doi.org/10.1084/jem.20060845>

OTTERBEIN, L. et al. MKK3 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Mediates Carbon Monoxide-Induced Protection Against Oxidant-Induced Lung Injury. *The American Journal of Pathology*, v. 163, n. 6, p. 2555-2563, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63610-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63610-3)

PEZERICO, S. et al. Evaluation of *Toxoplasma gondii* placental transmission in BALB/c mice model. *Experimental Parasitology*, v. 123, n. 2, p. 168-172, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.06.015>

PICCINNI, M.-P. P. Role of immune cells in pregnancy. *Autoimmunity*, v. 36, n. 1, p. 1-4, 6 fev. 2003.

<https://doi.org/10.1080/0891693031000067287>

PINARD, J. A.; LESLIE, N. S.; IRVINE, P. J. Maternal serologic screening for toxoplasmosis. *Journal of midwifery & women's health*, v. 48, n. 5, p. 308-16; quiz 386, 3 jan. 2003.

[https://doi.org/10.1016/S1526-9523\(03\)00279-4](https://doi.org/10.1016/S1526-9523(03)00279-4)

PITTMAN, K. J.; KNOLL, L. J. Long-Term Relationships: the Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* during Acute and Chronic Infections. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, v. 79, n. 4, p. 387-401, 2 dez. 2015.

<https://doi.org/10.1128/MMBR.00027-15>

RABILLOUD, M.; WALLON, M.; PEYRON, F. In utero and at birth diagnosis of congenital toxoplasmosis: use of likelihood ratios for clinical management. *The Pediatric infectious disease journal*, v. 29, n. 5, p. 421-5, 6 maio 2010.

<https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3181c80493>

RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology today*, v. 18, n. 10, p. 478-82, 3 out. 1997.

[https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)01127-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)01127-4)

REDLINE, R. et al. Differential expression of insulin-like growth factor-II in specific regions of the late (post day 9.5) murine placenta. *Molecular Reproduction and Development*, v. 36, n. 2, p. 121-129, 1993.

<https://doi.org/10.1002/mrd.1080360202>

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.-L. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical microbiology reviews*, v. 25, n. 2, p. 264-96, abr. 2012.

<https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

SENEGAS et al. *Toxoplasma gondii*-induced foetal resorption in mice involves interferon- γ -induced apoptosis and spiral artery dilation at the maternofetal interface. *International Journal for Parasitology*, v. 39, n. 4, p. 481-487, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.009>

SHI, Y.; EVANS, J. E.; ROCK, K. L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, v. 425, n. 6957, p. 516-21, 4 out. 2003.

<https://doi.org/10.1038/nature01991>

SCHUMACHER, A. et al. Blockage of Heme Oxygenase-1 Abrogates the Protective Effect of Regulatory T Cells on Murine Pregnancy and Promotes the Maturation of Dendritic Cells. *PLoS ONE*, v. 7, n. 8, p. e42301, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042301>

TACHIBANA, M. et al. Expression of heme oxygenase-1 is associated with abortion caused by *Brucella abortus* infection in pregnant mice. *Microbial pathogenesis*, v. 45, n. 2, p. 105-9, 5 ago. 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.04.002>

TACHIBANA, M. et al. Protective role of heme oxygenase-1 in *Listeria monocytogenes*-induced abortion. *PloS one*, v. 6, n. 9, p. e25046, 6 jan. 2011.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025046>

TENHUNEN, R.; MARVER, H. S.; SCHMID, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 61, n. 2, p. 748-55, 2 out. 1968.

<https://doi.org/10.1073/pnas.61.2.748>

UNNO, A.; KITOH, K.; TAKASHIMA, Y. Up-regulation of hyaluronan receptors in *Toxoplasma gondii*-infected monocytic cells. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 391, n. 1, p. 477-80, 5 jan. 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.083>

WEGMANN, T. G. et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology today*, v. 14, n. 7, p. 353-6, 4 jul. 1993.

[https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90235-D](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90235-D)

WEINBERG, E. D. Pregnancy-associated immune suppression: risks and mechanisms. *Microbial pathogenesis*, v. 3, n. 6, p. 393-7, 2 dez. 1987.

[https://doi.org/10.1016/0882-4010\(87\)90009-X](https://doi.org/10.1016/0882-4010(87)90009-X)

WIESEL, P. et al. Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficient mice.

Circulation, v. 102, n. 24, p. 3015-22, 2 dez. 2000.

<https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.24.3015>

Y. et al. In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4+CD25+-regulatory T cells. Parasite Immunology, v. 30, n. 9, p. 471-481, 2008.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2008.01044.x>

YACHIE, A. et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. The Journal of clinical investigation, v. 103, n. 1, p. 129-35, 5 jan. 1999.

<https://doi.org/10.1172/JCI4165>

ZHANG, H. et al. The Treg/Th17 Imbalance in *Toxoplasma gondii*-Infected Pregnant Mice. American Journal of Reproductive Immunology, v. 67, n. 2, p. 112-121, 2012.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01065.x>

ZHAO et al. Effect of Heme Oxygenase-1 Deficiency on Placental Development. Placenta, v. 30, n. 10, p. 861-868, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.07.012>

ZENCLUSSEN, M. L. et al. Over-expression of heme oxygenase-1 by adenoviral gene transfer improves pregnancy outcome in a murine model of abortion. Journal of reproductive immunology, v. 69, n. 1, p. 35-52, 3 fev. 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.jri.2005.10.001>

ZENCLUSSEN, M. L. et al. Haem oxygenase-1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. The Journal of pathology, v. 225, n. 2, p. 293-304, 6 out. 2011.

<https://doi.org/10.1002/path.2946>

8. ANEXOS

8.1 Protocolo de dosagem de bilirrubina.

DOSAGEM DE BILIRRUBINA (KIT LABTEST)

PREPARO DO PADRÃO:

Reagentes:

1. Padrão de bilirrubina (armazenar bem vedado para evitar evaporação)
2. Diluente – DMSO (o reagente adquire estado sólido em temperaturas inferiores a 18°C. Nesse caso aquecer a 37°C e homogeneizar até liquefação completa)

Obs 1: Manter o frasco ao abrigo da luz durante a preparação e manuseio do padrão

- Adicionar 3 ml do diluente (reagente nº 2) ao frasco do padrão (reagente nº 1), que contem 0,3mg de bilirrubina aderida de forma homogênea à parede;
- Homogeneizar e deixar em repouso – 5’;
- Homogeneizar novamente.

Obs 2: O padrão, protegido da luz, é estável por 12 horas entre 2 – 8°C e 1 mês a -20°C
(deve ser congelado e descongelado uma só vez)

Obs 3: A concentração do padrão é 10mg/dl

PROCEDIMENTO (amostras e padrão)

Reagentes:

1. Acelerador
2. Ácido sulfanílico
3. Nitrito de sódio

Preparo do diazo reagente:

0,01 ml de nitrito de sódio (reagente nº 3)

0,3 ml do ácido sulfanílico (reagente nº 2)

	PADRÃO		AMOSTRAS		
	Branco	Padrão	Branco	Direta	Total
Água destilada ou deionizada			200 µl	200 µl	
Acelarador (nº 1)	200 µl	200 µl			200 µl
Ácido sulfanílico (nº 2)	20 µl		20 µl		
Diazo reagente		20 µl		20 µl	20 µl
Amostra			10 µl	10 µl	10 µl
Padrão	10 µl	10 µl			

- Misturar e esperar 5 minutos;

- Determinar as absorvâncias em 525 nm ou filtro verde (500 a 540) acertando o zero com o branco. A cor é estável por 30 minutos.

CÁLCULOS:

$$1. \text{ Bilirrubina (mg/dl)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 10$$

$$2. \text{ Fator de calibração} = \frac{\text{Concentração do padrão (mg/dl)}}{\text{Absorbância do padrão (média)}} \times 10$$

$$\text{Bilirrubina (mg/dl)} = \text{Absorbância do teste} \times \text{Fator}$$

Linearidade

A medição é linear até 25 mg/dl. Quando for obtido um valor ≥ 25 mg/dl, diluir a amostra com NaCl 0,85%, realizar nova medição e multiplicar o resultado pelo fator de diluição. Diluir a amostra de tal modo que o valor encontrado se situe entre 1 e 10 mg/dl.

8.2 Certificado de aprovação no Comitê de ética e pesquisa em animais da UFU.



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Papel da Heme oxigenase-1 na toxoplasmose congênita experimental de camundongos”, protocolo nº 103/17, sob a responsabilidade de **Neide Maria Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA)** da **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**, em reunião 23 de Fevereiro de 2018.

(We certify that the project entitled “Papel da Heme oxigenase-1 na toxoplasmose congênita experimental de camundongos”, protocol 103/17, under the responsibility of Neide Maria Silva - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of February 23th, 2018).

Vigência do Projeto	Início: 01/04/2018 Término: 30/07/2019
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Mus musculus – camundongo
Número de animais	246
Peso / Idade	22 g / 8 – 12
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	Centro de Biotério e Experimentação Animal - CBEA
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 02 de março de 2018.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUAUFU